

**Optimierung der Kultivierung und Monitoring  
der Proliferation und Differenzierung humaner primärer  
Knochenvorläuferzellen**

Vom Fachbereich für Biowissenschaften und Psychologie  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte  
**D i s s e r t a t i o n**

von  
**Ingrida Majore**  
aus Riga, Lettland

1. Referent: apl. Prof. Dr. R. Wagner

2. Referentin: Prof. C. Müller-Goymann

Eingereicht am: 14.07.2005

Mündliche Prüfung (Disputation) am: 28.11.2005

Druckjahr: 2005

## **Vorwort**

Diese Dissertation entstand während meiner Tätigkeit in der Abteilung *Zellkulturtechnik*, später *Bioverfahrenstechnik* an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) in Braunschweig im Rahmen des von der Europäischen Union geförderten Projektes „Tissue Reactor“.

Ich danke allen, die mich während der Entstehung der Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt aber meinem Betreuer Herrn **Dr. V. Jäger** und Herrn **Prof. Dr. R. Wagner** für die Möglichkeit an diesem äußerst interessanten Thema arbeiten zu dürfen und für die gute Begleitung meiner Arbeit.

Frau **Prof. Dr. Müller-Goymann** danke ich für die Übernahme der Aufgabe des zweiten Referenten und der damit verbundenen Mühen.

Weiterhin möchte ich Herrn **Dr. M. Barthold** und Herrn **Dr. M. M. Hosseini** für die gute Zusammenarbeit und die wertvollen wissenschaftlichen Diskussionen, die meine Arbeit bereichert haben, danken.

Herrn Prof. **Dr. H. Mayer** und Frau **Dr. R. Fuhrmann** danke ich herzlich für die Bereitstellung des Zellmaterials und für ihre wissenschaftliche Beratung.

Ebenso danke ich Herrn **Dr. F. Stahl**, Herrn **Dr. R. Geffers**, Frau **S. Lose** und Herrn **R. Schulz** für die intensive Einführung in die Microarray-Analyse der differentiellen Genexpression und die Unterstützung bei der Durchführung der Microarray-Experimente.

Ich danke ebenfalls **allen Kollegen** aus der Arbeitsgruppe des Knochen-Tissue-Engineerings und der ehemaligen Abteilung *Zellkulturtechnik der GBF*.

Mein besonders herzlicher Dank gilt meinem **Ehemann Willi Schneider**, der während der letzten Jahre viel Geduld und Verständnis gezeigt und mich immer unterstützt hat.

## Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung des Fachbereichs für Biowissenschaften und Psychologie, vertreten durch den Mentor, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### Publikationen

Marc Barthold, Samira Fargali, **Ingrida Majore**, Nadia Zghoul, Frank Stahl, Manfred Rohde, Hubert Mayer, Volker Jäger (2003). Proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on calcium phosphate scaffolds in fixed bed bioreactors. *Tissue Eng.* **9**, 848.

Volker Jäger, Marc Barthold, Samira Fargali, **Ingrida Majore**, Nadia Zghoul, Frank Stahl, Manfred Rohde, Hubert Mayer (2003). 3D-cultivation and monitoring of bone precursor cells on calcium phosphate scaffolds in fixed bed bioreactors. *Int J Artif Org.* **26**, 829.

**Ingrida Majore**, Marc Barthold, Frank Stahl, René Schulz, Susann Lose, Hubert Mayer, Samira Fargali, Volker Jäger (2003). Optimization of cell culture conditions and comparative analysis of the proliferation and differentiation of human osteoprogenitor cells by DNA microarray analysis and non-invasive methods. *Int J Artif Org.* **26**, 869.

Marc Barthold, **Ingrida Majore**, Samira Fargali, Frank Stahl, René Schulz, Susann Lose, Hubert Mayer, Volker Jäger (2005). 3D-cultivation and characterization of osteogenic cells for the production of highly viable bone tissue implants. In: Gódia F., Fussenegger M. (Hrsg.) *Animal cell Technology meets genomics*, 199-205.

Volker Jäger, **Ingrida Majore**, Hubert Mayer, M. Morris Hosseini (2005). Basal media formulations and calcium concentrations as switches for controlled proliferation and differentiation of human osteogenic cells in vitro. *Int J Artif Org.* **28**, 385.

### Tagungsbeiträge

Marc Barthold, Samira Fargali, **Ingrida Majore**, Nadia Zghoul, Volker Jäger (2003). Herstellung von hochvitalen Knochenimplantaten in Festbett-Perfusionsbioreaktoren (Poster). 21. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen/Forum Life Science 2003, München.

Marc Barthold, **Ingrida Majore**, Samira Fargali, Frank Stahl, René Schulz, Susann Lose, Hubert Mayer, Volker Jäger (2003). 3D-cultivation and characterization of osteogenic cells for the production of highly viable bone tissue implants (Vortrag). 18<sup>th</sup> ESACT-Meeting, Granada, Spanien.

Marc Barthold, Samira Fargali, **Ingrida Majore**, Nadia Zghoul, Frank Stahl, Manfred Rohde, Hubert Mayer, Volker Jäger (2003). Proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on calcium phosphate scaffolds in fixed bed bioreactors (Poster). 2<sup>nd</sup> Meeting of the European Tissue Engineering Society, Genua, Italien.

**Ingrida Majore**, Marc Barthold, Frank Stahl, René Schulz, Susann Lose, Hubert Mayer, Samira Fargali, Volker Jäger (2003). Optimization of cell culture conditions and comparative analysis of the proliferation and differentiation of human osteoprogenitor cells by DNA microarray analysis and non-invasive methods (Poster). 1<sup>st</sup> World Congress on Regenerative Medicine, Leipzig.

Volker Jäger, **Ingrida Majore**, Hubert Mayer, M. Morris Hosseini (2005). Basal media formulations and calcium concentrations as switches for controlled proliferation and differentiation of human osteogenic cells in vitro (Poster). 2<sup>nd</sup> World Congress on Regenerative Medicine, Leipzig.

**Ingrida Majore**, M. Morris Hosseini, Hubert Mayer, Volker Jäger (2005). Influence of basal media formulations and calcium on growth and directed differentiation of human osteogenic cells in vitro (Poster). 19<sup>th</sup> ESACT-Meeting, Harrogate, England.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Knochengewebe</b>	<b>1</b>
1.1.1 Anatomie des Knochens	2
1.1.2 Struktur des Knochengewebes	4
1.1.3 Entwicklung, Wachstum und Umbau des Knochengewebes	6
1.1.4 Regeneration des Knochengewebes nach einer Fraktur	8
1.1.5 Zellen im Knochengewebe	10
1.1.5.1 Osteoblasten	10
1.1.5.2 Osteozyten	11
1.1.5.3 Bone Lining Cells	12
1.1.5.4 Osteoklasten	12
1.1.5.5 Mesenchymale Stammzellen	13
1.1.5.6 Knochenvorläuferzellen und die osteogene Differenzierung	14
1.1.6 Extrazelluläre Matrix des Knochengewebes	18
<b>1.2 Kultivierung osteogener Zellen und die Knochenbildung in vitro</b>	<b>20</b>
1.2.1 Phasen der Osteogenese in vitro	20
1.2.2 Wichtigste Marker der Osteogenese	21
1.2.2.1 Transkriptionsfaktoren	22
1.2.2.2 Membran- und Adhäsionsproteine	23
1.2.2.3 Proteine der extrazellulären Matrix	27
1.2.2.4 Zytokine	30
<b>1.3 Tissue Engineering des Knochengewebes</b>	<b>46</b>
1.3.1 Strategien des Knochen-Tissue-Engineerings	46
1.3.2 Potentielle klinische Anwendungen des in vitro hergestellten Knochengewebes	49
<b>1.4 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>50</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>52</b>
<b>2.1 Kultivierung humaner primärer Knochenvorläuferzellen</b>	<b>52</b>
2.1.1 Verwendetes Zellmaterial	52
2.1.2 Für die Kultivierung benutzte Medien, Lösungen und Medienzusätze	53
2.1.3 Beschichtung von Kulturgefäßen	57
2.1.4 Primärkultur und Subkultivierung der Zellen	58
2.1.5 Kryokonservierung der Zellen	59

<b>2.2 Biochemische und immunologische Methoden</b>	59
2.2.1 Methoden zur Bestimmung von Zellproliferation und Zelltod	59
2.2.1.1 Zellzahlbestimmung und Berechnung der Verdopplungszeit	59
2.2.1.2 Quantitative Bestimmung von Gesamtprotein	60
2.2.1.3 Quantitative Bestimmung von Gesamt-DNA zur indirekten Zellzahlermittlung	62
2.2.1.4 Bestimmung der Lactatdehydrogenase(LDH)-Aktivität im Kulturüberstand und die Stabilität der LDH während der Lagerung der Proben	64
2.2.1.5 Apoptosebestimmung über die Aktivität der Caspasen 3 und 7	68
2.2.2 Methoden zur Bestimmung der metabolischen Aktivität der Zellen	70
2.2.2.1 Bestimmung der Zellvitalität mit dem WST-1-Reagenz	70
2.2.2.2 Quantitative Bestimmung von D-Glucose und L-Lactat im Kulturüberstand	71
2.2.3 Methoden zur Bestimmung von Zelldifferenzierung und Bildung extrazellulärer Matrix	72
2.2.3.1 Quantitative Bestimmung der Kollagen I-Bildung	72
2.2.3.2 Bestimmung der Aktivität membrangebundener alkalischer Phosphatase	74
2.2.3.3 Bestimmung der Aktivität alkalischer Phosphatase im Kulturüberstand	75
2.2.3.4 Quantitative Bestimmung von TGF- $\beta$ 1 im Kulturüberstand	76
2.2.4 Methoden zur Bestimmung der Matrix-Mineralisierung	79
2.2.4.1 Quantitative Bestimmung von Osteocalcin im Kulturüberstand	79
2.2.4.2 Quantitative Bestimmung der $\text{Ca}^{2+}$ -Einlagerung in der extrazellulären Matrix mit dem Calcium-Kit	81
2.2.4.3 Quantitative Bestimmung der $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Kulturüberstand	83
2.2.4.4 Bestimmung der $\text{Ca}^{2+}$ -Einlagerung in der extrazellulären Matrix mit dem Calcein-Test	83
2.2.5 Test zur Bestimmung der biologischen Aktivität von BMP-2	84
<b>2.3 Histologische Färbetechniken</b>	86
2.3.1 Alkalische-Phosphatase-Färbung	86
2.3.2 Von-Kossa-Färbung zur Visualisierung der Mineraleinlagerung in der extrazellulären Matrix	86
<b>2.4 Microarray-Analyse der Genexpression</b>	87
2.4.1 Entwicklung eines knorpelgewebespezifischen Oligonukleotid-Microarrays	89

2.4.2	Für die Microarray-Analyse benötigte Reagenzien und Lösungen ....	92
2.4.3	Herstellung der Oligonukleotid-Microarrays .....	95
2.4.4	Isolierung der Gesamt-RNA .....	96
2.4.5	Synthese der markierten cDNA .....	97
2.4.6	Aufreinigung der synthetisierten cDNA .....	98
2.4.7	Überprüfung der markierten cDNA .....	99
2.4.8	Hybridisierung der markierten cDNA auf dem Microarray .....	100
2.4.9	Signaldetektion und Scannen des Microarrays .....	102
2.4.10	Mathematische Auswertung der Daten aus den Microarray-Experimenten .....	104
2.4.11	Reproduzierbarkeit der Microarray-Experimente .....	105
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>107</b>
<b>3.1</b>	<b><i>Bestimmung des für die Kultivierung humaner osteogener Zellen optimalen Basalmediums</i> .....</b>	<b>107</b>
3.1.1	Zellproliferation und Zelltod in vier verschiedenen Basalmedien .....	108
3.1.2	Zelldifferenzierung in vier verschiedenen Basalmedien .....	110
3.1.2.1	Bildung und Reifung der extrazellulären Matrix .....	111
3.1.2.2	Mineralisierung der extrazellulären Matrix .....	113
3.1.3	Ca <sup>2+</sup> - Konzentrationen in Basalmedien und deren Einfluss auf den Mineralisierungsprozess .....	116
3.1.4	Vergleich der Genexpression in osteogenen Zellen, die in $\alpha$ MEM und ZKT-I-Medium kultiviert wurden .....	121
3.1.5	Bewertung der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und ECM-Mineralisierung in den vier getesteten Basalmedien .....	123
<b>3.2</b>	<b><i>Bestimmung des für die Vermehrung humaner osteogener Zellen optimalen Basalmediums</i> .....</b>	<b>125</b>
<b>3.3</b>	<b><i>Vergleich der Kultivierung humaner osteogener Zellen in mit FBS oder Humanserum angereicherten Medien</i> .....</b>	<b>129</b>
3.3.1	Vergleich der Zellproliferation und -differenzierung in mit FBS oder Humanserum angereicherten Medien .....	129
3.3.2	Vergleich des Genexpressionsprofils bei der Kultivierung humaner osteogener Zellen in mit FBS oder Humanserum angereicherten Medien .....	133
3.3.3	Bewertung der Kultivierung humaner osteogener Zellen in einem mit FBS angereicherten Medium .....	137
<b>3.4</b>	<b><i>Entwicklung eines für die Kultivierung humaner osteogener Zellen geeigneten serumreduzierten Mediums</i> .....</b>	<b>138</b>
3.4.1	Bestimmung der geeigneten Komposition von Wachstumsfaktoren	140
3.4.2	Bestimmung der geeigneten Konzentration von Wachstumsfaktoren	145



3.4.3	Vergleich des Genexpressionprofils bei der Kultivierung humaner osteogener Zellen in mit 10 % Humanserum angereichertem und in serumreduziertem Medium.....	152
3.4.4	Bewertung der Kultivierung humaner osteogener Zellen in serumreduziertem Medium .....	156
3.4.5	BMP-2 als Supplement zur Verbesserung serumreduzierter Medien	157
3.4.5.1	Bestimmung der biologischen Aktivität von rhBMP-2 aus verschiedenen Chargen .....	158
3.4.5.2	Bestimmung einer für die Kultivierung der humanen primären osteogenen Zellen geeigneten rhBMP-2-Konzentration .....	160
<b>3.5</b>	<b><i>Möglichkeiten der Steuerung von Proliferation und Differenzierung humaner Knochenvorläuferzellen und ihre potentiellen Anwendungen im Kontext des Knochen-Tissue-Engineerings</i></b> .....	<b>166</b>
<b>3.6</b>	<b><i>Auswahl analytischer Methoden zum umfangreichen Monitoring von Proliferation und Differenzierung humaner osteogener Zellen</i></b> .....	<b>169</b>
3.6.1	Invasive und nicht-invasive analytische Methoden .....	169
3.6.2	Prüfung der Informativität der getesteten Analysetechniken und der Korrelationen zwischen einzelnen invasiven und nicht-invasiven analytischen Methoden .....	170
3.6.3	Geeignete nicht-invasive analytische Methoden .....	180
3.6.4	Bewertung der Informativität des entwickelten knochenspezifischen Microarrays und die Perspektiven seines Einsatzes im Bereich des Knochen-Tissue-Engineerings .....	184
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b> .....	<b>189</b>
<b>5</b>	<b>Abkürzungen</b> .....	<b>192</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>195</b>

## **1 Einleitung**

Bereits 1993 definierten Langer und Vacanti Tissue Engineering als ein interdisziplinäres Wissenschaftsgebiet in dem gleichermaßen Grundsätze aus den Ingenieurs- und Naturwissenschaften mit dem Ziel angewendet werden bioartifiziellen Ersatz für Organe zu schaffen oder deren Funktion zu verbessern oder zumindest aufrecht zu erhalten [Langer & Vacanti, 1993].

Heutzutage ist Tissue Engineering ein sich äußerst schnell entwickelndes Fachgebiet, in dem die aktuellsten Erkenntnisse aus den Bereichen der Zell-, Entwicklungs-, Molekularbiologie, Biotechnologie sowie Biomaterialienforschung und der Entwicklung von Bioreaktoren einfließen und das nun als greifbare Alternative zur Gewebe und Organtransplantation betrachtet wird.

Im Laufe der 90er Jahre haben Wissenschaftler versucht Ersatz für eine ganze Reihe körpereigener Gewebearten zu entwickeln, einige davon, z. B. Haut oder Leber- und Nierenfunktion unterstützende Systeme wurden auch erfolgreich hergestellt und in der Klinik eingesetzt [Chapekar, 2000]. In dieser Zeit wurden auch bemerkenswerte Erfolge auf dem Gebiet der Entwicklung von Gewebe für orthopädische Anwendungen – für die Wiederherstellung von Knochen, Knorpel, Sehnen und Bänder erreicht.

Die folgende Arbeit ist dem Thema des Knochen-Tissue-Engineerings gewidmet. Das wichtigste Ziel des Knochen-Tissue-Engineerings ist die In-vitro-Herstellung von vitalem, voll funktionsfähigem Knochengewebe oder zumindest dessen komplexer Vorstufen, welche nach der Transplantation nicht nur zur Defektüberbrückung, sondern auch zur vollständigen Funktionsfähigkeit des wiederhergestellten Knochens führen [Teschner, 1999]. Erfolgreiches Arbeiten auf diesem Gebiet erfordert ein eingehendes Wissen über Aufbau, Entwicklung und Regeneration des Knochengewebes und der hierbei erfolgenden biochemischen Abläufe sowie Kenntnis der grundlegenden Prinzipien des Knochen-Tissue-Engineerings. Diese Themen werden in den nachfolgenden Kapiteln der Arbeit näher betrachtet.

### **1.1 Knochengewebe**

Knochengewebe (Textus osseus) ist gleich dem Knorpelgewebe eine besondere, hochspezialisierte Form des straffen Bindegewebes, das im Körper der Vertebraten dort anzutreffen ist, wo beträchtliche Zug- oder Druckbelastungen auftreten oder über größere Distanzen weitergeleitet werden müssen.

Knochengewebe besteht aus gewebespezifischen Zellen, den Knochenzellen, vorwiegend aber aus extrazellulärer Matrix (ECM), die zu ca. 65 % aus anorganischen Material und nur zu ca. 35 % aus organischer Substanz geformt wird. Die Hauptaufgaben des Knochengewebes im Körper sind die Bildung des passiven Teils des Bewegungsapparates und der Schutz der inneren Organe. Außerdem ist das Skelett insgesamt ein bedeutender

Calcium- und Phosphorspeicher, auf den der Organismus jederzeit zugreifen kann; das Innere vieler Knochen ist zudem Produktionsstätte der meisten Blutzellen. Nach dem Zahnmaterial ist voll ausdifferenziertes Knochengewebe die härteste Substanz des Körpers; es besitzt eine außergewöhnliche Druck- und Zugfestigkeit und ist recht widerstandsfähig gegen Biegebeanspruchung.

### 1.1.1 Anatomie des Knochens

Der Form nach, können die über 200 Knochen des menschlichen Körpers in 3 große Gruppen eingeteilt werden:

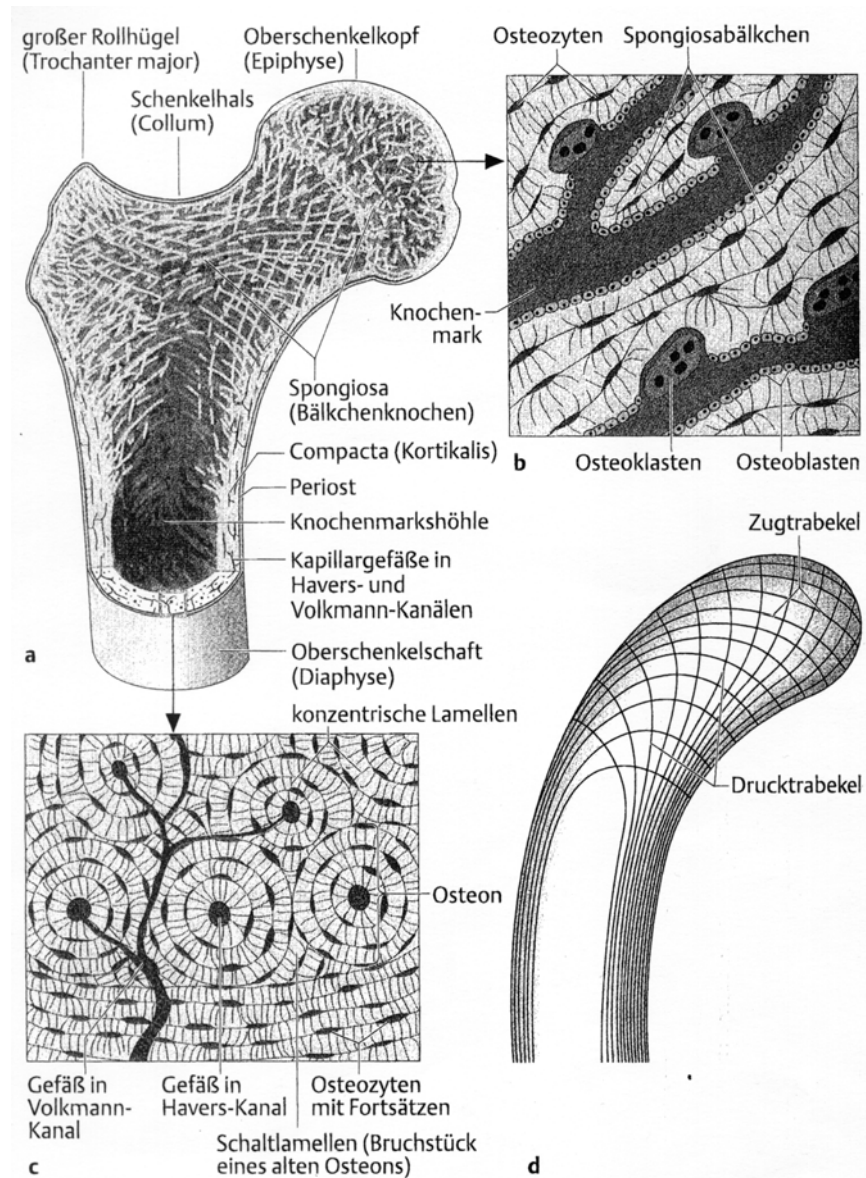
- die kurzen Knochen (z.B. die Handwurzelknochen, Wirbelknochen),
- die flachen Knochen, (z.B. die Knochen des Schädeldgewölbes, das Schulterblatt),
- die langen, so genannten röhrenförmigen Knochen (z.B. der Oberschenkelknochen (Femur), das Schienbein (Tibia), der Oberarmknochen (Humerus)).

Ein Röhrenknochen (Abb. 1.1a) besteht aus einem langen röhrenförmigen Schaft (Diaphyse), der mit zwei meist verdickten Enden (Epiphysen) abschließt. Der Abschnitt zwischen Epi- und Diaphyse wird als Metaphyse bzw. Epiphysenfuge bezeichnet und bildet die Längenwachstumszone eines Röhrenknochens (Abb. 1.3). Die beiden Epiphysen sind von einer dünnen Schicht aus hyalinem Knorpel bedeckt. Das Knorpelgewebe setzt die Reibung herab, wenn der Knochen zusammen mit einem anderen Knochen ein Gelenk formt.

Um das Gewicht des Skeletts zu reduzieren (das menschliche Skelett wiegt nur ca. 7 kg), ist bei den meisten der größeren Knochen nur die Außenschicht, die so genannte Kortikalis, aus dichtem Knochengewebe aufgebaut. Bei den röhrenförmigen Knochen ist diese Außenschicht relativ breit und wird als Kompakta (Substantia compacta) bezeichnet. Das Innere des Knochens besteht dagegen zum Großteil aus locker strukturierter schwammartiger Spongiosa (Substantia spongiosa), die von Knochenbälkchen (Trabekel) ausgebildet wird. Die Dicke der Kompakta und die Anordnung der Knochenbälkchen in der Spongiosa folgen funktionellen Anforderungen (Abb. 1.1d), d.h. sie sind genau der Art und Größe der Belastung, der das Knochengewebe ausgesetzt wird, angepasst [Einhorn, 1996].

Die in der Spongiosa zwischen Knochenbälkchen entstehenden Hohlräume werden durch das Knochenmark ausgefüllt. Rotes, d.h. blutbildendes Knochenmark findet man in der Spongiosa der meisten unregelmäßig geformten Knochen, sowie in den proximalen Epiphysen der Röhrenknochen des Oberarms und des Oberschenkels. Die Markhöhlen der übrigen Knochen sind beim Erwachsenen mit gelbem, fetthaltigem Knochenmark (Fettmark) gefüllt. Im Kindesalter enthalten auch die Diaphysen der Röhrenknochen blutbildendes Knochenmark, das jedoch allmählich in Fettmark umgewandelt wird und dann nicht mehr an der Hämatopoese teilnimmt. Spongioses Knochengewebe, hat im Vergleich zum kompakten Knochengewebe, das fast 80 % des voll entwickelten Skeletts bildet, eine ungefähr 20-mal

größere Innenoberfläche, besitzt eine viel höhere metabolische Aktivität und kann sich deutlich schneller an mechanische Belastungen anpassen.

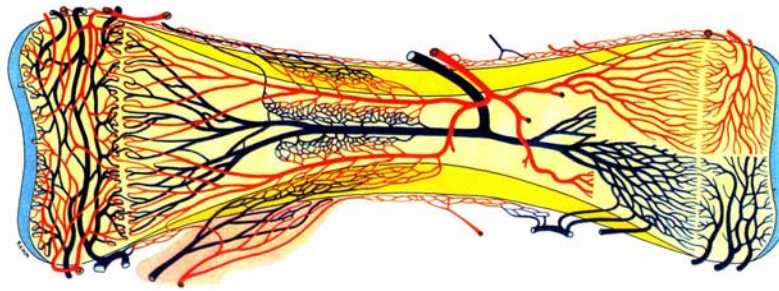


**Abb. 1.1**

**Schematische Darstellung des Knochengewebes am Beispiel des Oberschenkelknochens** [übernommen aus Plattner & Hentschel, 2002].

Von außen werden die Knochen von Knochenhaut, dem so genannten Periost bedeckt. Es umgibt den Knochen mit Ausnahme der Gelenkflächen und wird aus einer derben, faserigen Bindegewebsschicht gebildet, die dem Knochen fest anliegt. Periost besteht aus einer äußeren Kollagenschicht mit elastischen Fasern (Sharpey-Fasern) sowie einer inneren Schicht, die Nerven und Blutgefäße enthält. Ferner bildet es die Anheftungsstellen für Bänder und Sehnen, die mit dem Periost fest verwachsen. Die Binnenräume des Knochens werden von Endost ausgekleidet. Es bedeckt die Substantia compacta an ihren inneren Oberflächen,

überzieht die Knochenbälkchen in der Substantia spongiosa und grenzt somit das Knochengewebe insgesamt gegen die Bereiche ab, die das Knochenmark enthalten.



**Abb. 1.2**

**Schema der Blutversorgung eines Röhrenknochens** [übernommen aus Gray's Anatomy, 1995].

Da die Diffusion der Nährstoffe durch die mineralisierte Interzellulärsubstanz stark beschränkt ist, besitzen die voll ausdifferenzierten Knochen ein ausgeprägtes und kompliziert organisiertes Blutgefäßsystem, durch das Knochenmark, Knochengewebe sowie Periost und Endost versorgt werden (Abb. 1.2) und das den Knochen mit dem umliegenden Gewebe und den umliegenden Blutgefäßen verbindet. Sogar in der dicht geordneten Substantia compacta liegt keine der Knochenzellen weiter als 300 µm von einem Blutgefäß entfernt [Buckwalter et al., 1995a].

### 1.1.2 Struktur des Knochengewebes

Der voll ausdifferenzierte Knochen besitzt eine besondere Struktur. Die Extrazellulärmatrix liegt bei ihm in Form verschieden gestalteter und unterschiedlich organisierter Lamellen vor; deshalb wird er stets als Lamellenknochen bezeichnet. Jede Lamelle besteht aus in charakteristischer Weise orientierten, dick gepackten, Kollagen I-Fibrillen. Aufgrund ihrer funktionsbedingten Form und Anordnung werden vier Arten von Lamellen unterschieden:

- Speziallamellen,
- Schaltlamellen,
- Grundlamellen,
- Trabekellamellen der Spongiosa

Am Querschnitt durch die Kompakta eines Röhrenknochens wird die Verteilung der Lamellensysteme besonders deutlich (Abb. 1.1c). Die konzentrischen Speziallamellen, formen die Osteone (Havers-Systeme), die funktionellen Grundeinheiten des Lamellenknochens. Im Zentrum eines Osteons befindet sich ein zentraler Kanal (Havers-Kanal), um den die Knochenzellen (Osteozyten) und die Interzellulärsubstanz ringförmig angeordnet sind. Im Havers-Kanal verlaufen ein ernährendes Blutgefäß, ein Lymphgefäß und gelegentlich auch ein Nerv [Buckwalter et al., 1995a]. Die Osteozyten liegen in „pflaumenkernförmigen“ Knochenzellhöhlen, den so genannten Lakunen, in Reihen zwischen

den Lamellen. Über Zellfortsätze, die in winzigen Knochenkanälchen (Canaliculi ossei) verlaufen, und die Ausbildung von Gap junctions stehen sie untereinander mit anderen Knochenzelltypen und mit den blutgefäßführenden Kanälen in Verbindung. Zwischen den parallel und spiralig eingelagerten und dicht gepackten Kollagenfasern der röhrenförmigen Lamellen befinden sich die anorganischen Salze in Kristallform.

In einem im Aufbau befindlichen Osteon siedeln sich von innen knochenbildende Zellen an und im Folgenden wird eine neue Schicht der Knochensubstanz angebaut; dabei verlaufen in der angrenzend ausgebildeten konzentrischen Speziallamelle die Kollagenfasern gekreuzt zu den Fasern der jeweils vorangehenden Lamelle. Dieser abwechselnde Verlauf der Kollagenfasern in dem Osteon sichert die außergewöhnliche Widerstandsfähigkeit des Lamellenknochens gegen Druck- und Zugbeanspruchung sowie, wenn auch in geringerem Umfang, gegen Biegung und Torsion. Der Aufbau eines Osteons wird abgeschlossen, wenn in dem verbleibenden zentralen Kanal nur noch wenig Platz für etwas Bindegewebe und die zur Ernährung erforderlichen Blutgefäße verbleibt. Ein endgültig ausgebildetes Osteon ist ca. 1 cm lang und besteht aus 10-20 ineinander geschachtelten Speziallamellen. Die Osteone sind miteinander durch senkrechte oder schräg zur Knochenlängsachse verlaufende Volkmann-Kanäle verbunden. In Volkmann-Kanälen verlaufen arterielle Abzweigungen, die in die Gefäße der Havers-Kanäle münden. Durch das ausgeprägte Netzwerk der Knochenkanäle werden ebenfalls Verbindungen zwischen Periost, Endost und Knochenmark geschaffen.

Die Ausrichtung der Osteone entspricht der Richtung der einwirkenden Druck- und Zugkräfte. Ändert sich die Richtung der von außen einwirkenden Kräfte, können sich die betroffenen Osteone der neuen Lage durch Umbau anpassen. Daraus ergeben sich für die einzelnen Osteone und Osteonabschnitte oft sehr unterschiedliche Querschnittprofile. Von außen werden die Osteone von einer schmalen Zone faserarmer Kittsubstanz umgeben, die sie miteinander und mit den abgrenzenden Schaltlamellen verbindet, sie aber zugleich auch optisch abgrenzt. Der Raum zwischen den Osteonen wird von Schaltlamellen ausgefüllt. Die Schaltlamellen entstehen beim Umbau der Osteone, d.h. sie sind deren Bruchstücke und dementsprechend auch unterschiedlich geformt.

Die Außenzonen der Kompakta werden von den Grundlamellen arrangiert. Man unterscheidet zwei Typen der Grundlamellen – die äußeren und die inneren. Die äußeren Grundlamellen gestalten in mehreren Schichten den Sektor, der unmittelbar dem Periost anliegt; die inneren Grundlamellen formen die dem Endost benachbarte relativ schmale Zone der Kompakta. Sie sind feiner, weniger zahlreich und bilden häufig keinen durchgängig geschlossenen Lamellenverband.

Innerhalb der Spongiosa ist der Knochen ebenfalls lamellenartig aufgebaut (Abb. 1.1b), wobei die Lamellen die Form gebogener Platten und Bälkchen (Trabekeln) verschiedener Dicke und Länge haben. Da der Stoffaustausch hier ausschließlich durch Diffusion vom

umgebenden Knochenmark erfolgt, können die Knochenbälkchen nur eine bestimmte Stärke erreichen und sind nur 50-400 µm dick. Die Trabekel bilden sich unter dem Einfluss von mechanischer Beanspruchung in Form von Druck- und Zugtrabekeln. (Abb. 1.1d).

### **1.1.3 Entwicklung, Wachstum und Umbau des Knochengewebes**

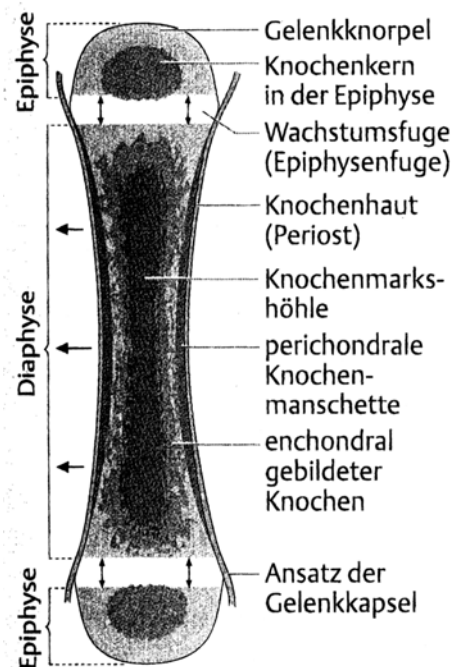
Die Struktur des ausdifferenzierten menschlichen Knochens, des Lamellenknochens, entsteht nicht primär. Zuerst wird in der Embryonalperiode, zumeist auch bei der Knochenbruchheilung, ein Geflechtknochen gebildet, der dann später allmählich durch Lamellenknochen ersetzt wird. Ab einem Alter von 5-6 Jahren bleibt der Geflechtknochen im menschlichen Körper nur an den Rändern der Schädelknochen und der Augenhöhlen und an den Anbindungsstellen von Sehnen und Bändern erhalten. Daneben wird Geflechtknochen auch in den Wachstumszonen des Skeletts gebildet.

Im Geflechtknochen sind der Verlauf der Kollagenfaserbündel, der Blutgefäße und die Einlagerungen der Salzkristalle ungeordnet. Zugleich unterscheidet er sich von dem Lamellenknochen durch eine ca. 4-mal größere Anzahl von in der Interzellulärsubstanz eingelagerten Osteozyten, einem höheren Wassergehalt und durch weniger ausgeprägte Mineralisierung. Demgemäß ist er viel leichter zu deformieren und wiegt mehr als der Lamellenknochen. Eigentlich entspricht der Geflechtknochen einem erhärteten, faserreichen Bindegewebe und kann direkt (durch desmale Ossifikation) oder indirekt (durch chondrale Ossifikation) entstehen.

Im Falle der desmalen Ossifikation wird der Geflechtknochen aus embryonalem mesenchymalem Bindegewebe gebildet, d.h. durch direkte Ausdifferenzierung mesenchymaler Zellen zu knochenbildenden Zellen (Osteoblasten). Auf diese Weise werden im menschlichen Skelett z.B. die Schädelknochen und die Schlüsselbeine gebildet. Bei der chondralen Ossifikation entsteht der Geflechtknochen indirekt, d.h. über eine knorpelige Vorstufe. Aus dem mesenchymalen Bindegewebe entwickelt sich zuerst ein winziges Modell aus embryonalem, hyalinem Knorpel, das in seiner Form bereits dem endgültigen Knochen entspricht. Während dieses Modell durch kontinuierliche Neuausbildung von Knorpelgewebe noch wächst, wird gleichzeitig früher gebildetes Knorpelgewebe durch knorpelabbauende Zellen (Chondroklasten) wieder abgebaut und mittels Osteoblasten durch Knochengewebe ersetzt - es bildet sich ein so genannter Ersatzknochen aus. Die meisten Knochen des menschlichen Körpers entstehen auf diese Art und Weise. Später wird der Geflechtknochen in Anpassung an ansteigende funktionelle Beanspruchungen, z.B. zunehmendes Körpergewicht, in den viel stabileren Lamellenknochen umgebaut.

Man unterscheidet zwei Formen der chondralen Ossifikation – die enchondrale und die perichondrale Ossifikation. Bei embryonaler Ausbildung eines Röhrenknochens fängt die enchondrale Ossifikation im Inneren der Knorpeldiaphyse an und breitet sich nach beiden

Seiten aus. So wird das eingeschlossene Knorpelgewebe allmählich abgebaut und durch Geflechtknochen ersetzt. Am Übergang der Diaphyse zu den Epiphysen entsteht eine knorpelige Wachstumsfuge (Epiphysenfuge) in der die Knorpelzellen bis zum Abschluss des Skelettwachstums proliferieren und so die Verlängerung eines Röhrenknochens gewährleisten (Abb. 1.3). Dabei ordnen sich die Knorpelzellen in Säulen an und bilden den Säulenknorpel aus. Da das Knorpelgewebe keine Blutgefäße besitzt, beginnen die vom Stoffwechsel mehr und mehr abgeschnittenen Knorpelzellen die sie umgebende Extrazellulärmatrix zu resorbieren. Dabei vergrößern sich die Knorpelzellhöhlen und ebenfalls die Knorpelzellen blasenartig und es entsteht der so genannte Blasenknorpel. Schließlich werden die Knorpelzellhöhlen von Chondroklasten geöffnet; in das Knorpelgewebe dringen Blutgefäße und knochenbildende Zellen ein und es beginnt der Knochenaufbau.



**Abb. 1.3**

**Aufbau und Darstellung der Wachstumszonen eines Röhrenknochens. Die Pfeile bezeichnen die Richtung des Längen- und Dickenwachstums** [übernommen aus Plattner & Hentschel, 2002].

Die perichondrale Ossifikation setzt hingegen an der Außenseite der Knorpeldiaphyse ein, und zwar mit der direkten Umwandlung von mesenchymalen Zellen aus dem perichondralen Bindegewebe zu Osteoblasten. Die Osteoblasten bilden einen Geflechtknochen, der die Diaphyse des Knorpelmodells manschettenartig umschließt und als perichondrale Knochenmanschette bezeichnet wird (Abb. 1.3). Diese Manschette breitet sich epiphysenwärts aus und unterbindet allmählich die Ernährung des unterliegenden Knorpels. Es entsteht zuerst ein Säulenknorpel, der durch den Blasenknorpel ersetzt wird. Gleichzeitig durch die Tätigkeit von Osteoklasten entstehen in der Knochenmanschette Kanälchen, die



das Eindringen von Blutgefäßen und mesenchymaler Zellen in den Blasenknorpel ermöglichen. Damit beginnt der Prozess der enchondralen Ossifikation. Das spätere Dickenwachstum eines Röhrenknochens wird dadurch erreicht, dass bereits an der Manschette entstandenes Knochengewebe von innen wieder abgebaut und von außen durch neu gebildetes ersetzt wird.

Während seiner Lebensdauer unterliegt das Skelettsystem der Vertebraten einem ständigem Umbau und Erneuerung. Einerseits wird Knochengewebe abgebaut (Knochenresorption) und andererseits wieder neu gebildet (Knochenaufbau), wobei beide Prozesse in verschiedenen Lebensabschnitten unterschiedlich stark ausgeprägt sind [Marks & Hermey, 1996]. In den zwei ersten Lebensdekaden des menschlichen Lebens übertrifft der Prozess des Knochenaufbaus eindeutig den Prozess der Knochenresorption, d.h. die beiden Komponenten des Knochenumbaus sind ungleich miteinander gekoppelt - es wird mehr Knochensubstanz gebildet als abgebaut. Im Laufe der nächsten drei Dekaden, während der Phase der Aufrechterhaltung des adulten Skeletts, verlaufen beide Prozesse gleich intensiv, d.h. die abgebaute Knochensubstanz wird im gesunden Organismus wieder mit präzise der gleichen Menge von neu gebildeten Knochen ersetzt. Nach der fünften Lebensdekade sind die Resorptions- und Aufbauprozesse meist wieder ungleich gekoppelt - die formative Komponente des Knochenumbaus wird schwächer, die Resorption des Knochengewebes überwiegt und führt zur Reduktion der Knochenmasse und der Belastbarkeit des Skeletts. Dadurch erhöht sich das Risiko der Knochenbrüche. Während der aktiven Wachstumsphase des menschlichen Körpers und des Skelettsystems ist die Gesamtintensität des Knochenumbaus enorm hoch. Im ersten Lebensjahr werden 100 % des menschlichen Skeletts umgebildet. In den nachfolgenden Jahren sinkt das Ausmaß des Knochenumbaus allmählich; im späten Kindesalter erreicht es ca. 10 % pro Jahr und bleibt auf diesem oder auf etwas niedrigerem Niveau während der gesamten Lebensdauer erhalten [Buckwalter et al., 1995b].

#### **1.1.4 Regeneration des Knochengewebes nach einer Fraktur**

Die Regeneration des Knochengewebes nach einer Fraktur ist ein komplexer und einzigartiger Prozess. Er beinhaltet eine Reihe von gut definierten zellulären sowie extrazellulären Ereignissen und unterscheidet sich wesentlich vom Heilungsprozess in anderen Gewebearten. Das Knochengewebe ist das einzige Gewebe, das ohne Narbenbildung heilt und bei dem eine komplette Wiederherstellung der Funktion gesichert wird. In der Regel bewahrt das Knochengewebe sein außergewöhnliches Regenerationspotenzial sogar bis ins hohe Alter.

Eine Knochenfraktur ist mit lokalem Verlust der Kontinuität des Knochens verbunden. Dabei werden meist nicht nur Kortikalis, Knochenmark und Periost, sondern auch das angrenzende weiche Gewebe verletzt. Dementsprechend startet die Regeneration des Knochengewebes

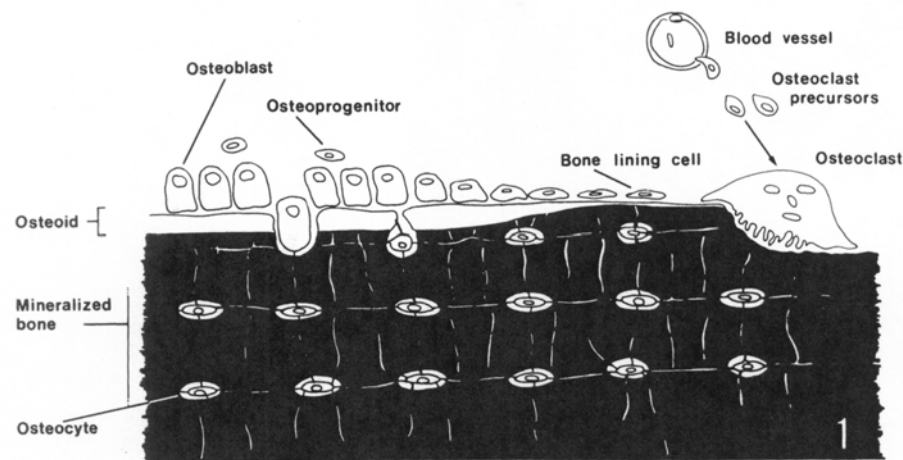
immer mit einer 2-3 Tage andauernden Entzündungsphase. Unmittelbar nach dem Knochenbruch entsteht ein Frakturhämatom, das anfangs die Lücke zwischen den Knochenfragmenten schließt und von in Fibrinmatrix eingebetteten Blutzellen, vorwiegend Erythrozyten und Thrombozyten ausgebildet wird. Während der Hämatom-Bildung werden von den aktivierten Blutplättchen eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Chemokinen und Enzymen freigegeben und in dem Frakturhämatom eingeschlossen. Die Wachstumsfaktoren fördern den Ablauf der nachfolgenden Regenerationsphasen – die Angiogenese, die Proliferation der fibroblastoiden und osteogenen Vorläuferzellen und die Synthese von Proteinen der extrazellulären Matrix. Zugleich dient die Fibrinmatrix als Trägermaterial, das die Einwanderung an der Knochenregeneration beteiligter Zellen sichert [Szczesny, 2002; Davies & Hosseini, 2000]. Der abrupte lokale Abbruch der Blutversorgung ist darüber hinaus mit ischämischen und nekrotischen Prozessen an den Frakturenenden und im beschädigten umliegenden Gewebe verbunden. Von dem ischämisch angesäuerten Milieu, Gewebeerfallprodukten und Chemokinen angezogen, wandern neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten in das Frakturhämatom ein. Am Ende der Entzündungsphase beginnen die neutrophilen Granulozyten und Makrophagen mit dem sukzessiven Abbau des Hämatoms.

In der nachfolgenden, ca. 3 Wochen anhaltenden Granulationsphase wird das Frakturhämatom allmählich abgebaut und durch Granulationsgewebe ersetzt. Aus dem perivaskulären Gewebe wandern in den Wundbereich proliferierende mesenchymale Progenitorzellen ein und starten mit der Synthese der Kollagenmatrix und der Ausbildung von fibrösem Gewebe. Starke Ansäuerung des Mikromilieus im zentralen Bereich der Frakturspalte, die von Hypoxie und anaeroben Metabolismus verursacht wird, der bestehende Gradient der Sauerstoffkonzentration sowie die von neutrophilen Granulozyten abgesonderten Kinine und Prostaglandine zugleich fördern die Angiogenese. Mit der Angiogenese wandern in die Frakturspalte osteogene Vorläuferzellen aus Knochenmark, Endost und Periost ein. Das ausgebildete Granulationsgewebe ist reich an Wachstums- und Differenzierungsfaktoren und extrem gut vaskularisiert – ca. 60 % seines Gesamtvolumens nehmen Blutkapillaren ein [Davies & Hosseini, 2000].

In der nächsten Phase der Kallusbildung und Härtung wird das Granulationsgewebe graduell durch mechanisch stabileres Gewebe ersetzt. Abhängig von der Breite der Frakturspalte, dem Partialdruck des Sauerstoffs und der Effizienz der Immobilisierung der Fraktur wird das Granulationsgewebe zuerst durch das Knorpelgewebe und dann durch Geflechtknochen (enchondrale Ossifikation) oder unmittelbar durch Geflechtknochen (desmale Ossifikation) ersetzt [Brighton & Hunt, 1991]. Zum Schluss wird der Geflechtknochen in einen Lamellenknochen umgebaut. Der Prozess der Kallusbildung und Härtung kann mehrere Wochen bis Monate, die abschließende Phase des Knochenumbaus – sogar mehrere Jahre dauern.

### 1.1.5 Zellen im Knochengewebe

Die Prozesse des Knochenaufbaus, der Knochenresorption und der Regeneration sind mit den Aktivitäten der gewebespezifischen Zellen fest verbunden. Im Knochengewebe sind unterschiedliche Zelltypen anzutreffen: die auf den Oberflächen (im Periost und Endost) des Knochengewebes lokalisierten Osteoblasten, Osteoklasten und Bone Lining Cells und die in der Extrazellulärmatrix des Knochengewebes eingeschlossenen Osteozyten sowie die an den Prozessen von Knochenregeneration und -umbau beteiligten mesenchymalen Stammzellen (MSC) und Osteoprogenitorzellen (Abb. 1.4). Sie unterscheiden sich in Hinsicht auf ihre Morphologie und Funktion und - im Falle der Osteoklasten - auch in Bezug auf ihre Herkunft.



**Abb. 1.4**

**Schematische Darstellung der Lokalisierung von Knochenzellen im Knochengewebe** [übernommen aus Marks & Hermey, 1996].

#### 1.1.5.1 Osteoblasten

Die kubisch oder hochprismatisch geformten Osteoblasten sind voll ausdifferenzierte knochenbildende Zellen mesenchymalen Ursprungs, die auf den Oberflächen des Knochens nur zu Zeiten des Knochenaufbaus anzutreffen sind. Während des Prozesses der Knochenbildung liegen die Osteoblasten fast immer dicht beieinander, schaffen auf der Oberfläche des Knochens eine epithelähnliche Schicht und halten über kurze, feine Ansätze untereinander Kontakt. Sie sind typische proteinbildende Zellen und besitzen dementsprechend einen ausgeprägten Golgi-Apparat, ein gut entwickeltes raues endoplasmatisches Retikulum und sind reich an Mitochondrien. Osteoblasten produzieren Kollagen I und andere Proteine der extrazellulären Knochenmatrix und regulieren ferner deren Mineralisierung. Gewöhnlich ist die Bildung der Matrix polarisiert, d.h. sie findet auf der Oberfläche des Knochens unter den Osteoblasten statt; deshalb existiert hier andauernd eine dünne Schicht nicht mineralisierter Knochenmatrix, der so genannte Osteoid (Abb. 1.4). Zugleich wird ein Teil der metabolisch aktiven Osteoblasten in die extrazelluläre Matrix „eingemauert“. Diese entfernen sich allmählich von den benachbarten Osteoblasten und

wandeln sich in Osteozyten um. Andere Osteoblasten bleiben auf der Oberfläche des Knochens liegen, verringern ihre synthetische Aktivität, werden flacher und organisieren sich zu Bone Lining Cells um. Sie bedecken die meisten ruhenden, nicht im Umbau befindlichen Knochenoberflächen. Nach dem Abschluss der Knochenbildung wird jedoch der Großteil der Osteoblasten von der Oberfläche des Knochens durch einen derzeit noch nicht geklärten Mechanismus entfernt [Buckwalter et al., 1995a].

#### 1.1.5.2 Osteozyten

Osteozyten sind in der extrazellulären Knochenmatrix eingeschlossene ausgereifte Osteoblasten und der im Knochengewebe am häufigsten anzutreffende Zelltyp. Der adulte Knochen enthält etwa 10-mal mehr Osteozyten als Osteoblasten und die Anzahl der hier anzutreffenden Osteoklasten macht nur einen kleinen Bruchteil jener der Osteozyten aus [Nijweide et al., 1996].

Die Osteozyten liegen in „pflaumenkernförmigen“ Lakunen. Da die Diffusion der Nährstoffe und der Metabolite durch die mineralisierte Knochenmatrix stark begrenzt ist, stehen sie über lange zytoplasmatische Fortsätze und Gap junctions miteinander und mit umliegenden Osteoblasten, Osteoklasten, wie auch mit den Bone Lining Cells im Endost und Periost und blutgefäßführenden Kanälen des Knochens in Kontakt. Dieses Netzwerk ist äußerst empfindlich gegenüber mechanischer Beanspruchung und bildet zusammen mit den Osteozyten den Mechanosensor des Knochengewebes. Schon eine 0,2-0,4%ige Deformation der Membran des Osteozyten führt zur Auslösung eines intrazellulären chemischen Signals [Szczesny, 2002]. Ferner sind die Osteozyten für das Aufrechterhalten der Knochenmatrix zuständig; dennoch sind sie in der Lage die Matrix auch zu resorbieren. Man unterscheidet zwei Typen von Osteozyten: die matrixproduzierenden Osteozyten und die osteolytischen Osteozyten [Marks & Hermey, 1996]. Matrixproduzierende Osteozyten besitzen relativ viele zelluläre Organellen, die für Produktion und Sekretion der Knochenmatrix notwendig sind. Dabei variiert die Organellenanzahl und das Volumen des Zytoplasmas in Abhängigkeit von Alter und synthetischer Aktivität des matrixproduzierenden Osteozytes [Buckwalter et al., 1995a]. In der Regel existiert zwischen den Osteozyten und ihren Fortsätzen einerseits und der Wand der Knochenzellhöhlen-Knochenkanälchen-Systems andererseits eine dünne Schicht nicht mineralisierter Knochenmatrix, die das Medium für den intraossealen Stoffaustausch schafft. Osteolytische Osteozyten enthalten dagegen lysosomale Vakuolen, die für phagozytierende Zellen typisch sind [Marks & Hermey, 1996]. Stimuliert durch das Parathormon, das Hormon der Nebenschilddrüsen, können sie die umliegende mineralisierte Extrazellulärsubstanz auflösen, das freigesetzte Calcium resorbieren und dem Blut zuführen

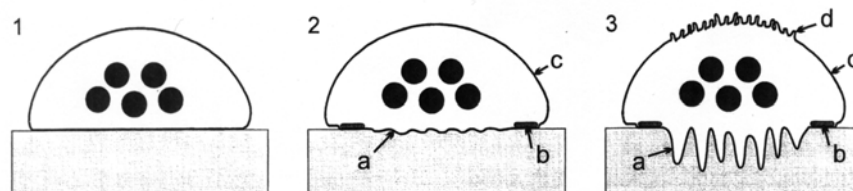
### 1.1.5.3 Bone Lining Cells

Bone Lining Cells sind flachgestreckte, epithelähnliche, metabolisch inaktive Zellen, die nur wenig Zytoplasma und eine geringe Anzahl von Organellen aufweisen. Sie bedecken fortlaufend die nicht im Umbau befindlichen Knochenoberflächen und die Oberflächen von Volkmann- und Havers-Kanälen. Durch zytoplasmatische Fortsätze und Gap junctions sind sie miteinander und mit benachbarten Osteozyten vernetzt.

Ihre Rolle im Prozess von Knochenumbau und Knochenbildung ist bis jetzt noch nicht eindeutig geklärt. Es wird vermutet, dass Bone Lining Cells ruhende Osteoblasten oder Vorläufer der Osteoblasten sind, die, entsprechend angeregt, wieder in den „aktiven“ Zustand zurückkehren können [Marks & Hermey, 1996]. Fernerhin ist es nachgewiesen, dass, durch das Parathormon stimuliert, die Bone Lining Cells Enzyme (Kollagenasen) ausscheiden, die die dünne Schicht des Osteoids über der mineralisierten Matrix auflösen und so die Knochenoberfläche für die Anhaftung der knochenresorbierenden Osteoklasten vorbereiten [Buckwalter et al., 1995a; Szczesny, 2002].

### 1.1.5.4 Osteoklasten

Osteoklasten sind mobile, vielkernige, bis 20 µm große Riesenzellen, die auf den Knochenoberflächen zum Zeitpunkt der Knochenresorption vorzufinden sind. Im Gegensatz zu anderen Knochenzellen sind sie hämatopoetischer Abstammung, d.h. sie entstehen aus im Knochenmark oder im Blutkreislauf vorkommenden Monozyten/Makrophagen-Vorläufern, die sich an Orten der Knochenresorption ansammeln und bei Bedarf zu Osteoklasten verschmelzen. Sie sind die wichtigsten, wenn auch nicht die einzigen Zellen, die für die Resorption des Knochengewebes zuständig sind.



**Abb. 1.5**

Schematische Darstellung eines Osteoklasten im Ruhestadium (1), unmittelbar nach dem Anheften an die Knochenoberfläche (2) und während der Knochenresorption (3). In dieser Zeit sind der Plasmamembran 4 Domänen zu erkennen: **a** - Bürstensaum, **b** - Versiegelungszone; **c** - Basalmembran und **d** - apikale Oberfläche [übernommen aus Väänänen, 1996].

Ein typischer Osteoklast hat 3-20 Zellkerne, ist reich an Mitochondrien, Vakuolen, Endosomen und Lysosomen, besitzt einen ausgeprägten Golgi-Apparat, und, im Kontrast zu der Größe der Zelle, ein relativ spärliches raues endoplasmatisches Retikulum.

Aktive Osteoklasten haben einen direkten Kontakt mit der Knochenoberfläche und befinden sich in Gruben, den so genannten Resorptionsbuchten. Ein resorbierender Osteoklast (Abb. 1.4, 1.5) ist eine stark polarisierte Zelle. Die Zellkerne befinden sich gewöhnlich im oberen, von der Knochenoberfläche am weitesten entfernten Bereich des Zytoplasmas und

es sind mehrere Areale der Plasmamembran eindeutig zu erkennen. In der zentralen, durch Mikrovilli erheblich vergrößerten Zone der Plasmamembran, die auch als Bürstensaum bezeichnet wird, findet die Knochenresorption statt. Die umliegende Versiegelungszone dient zum Anheften des Osteoklasten an die Oberfläche des Knochens. Sie ist reich an Mikrofilamenten und fast frei von Organellen. Der Rest der Plasmamembran wird als Basalmembran bezeichnet. Bei einem aktiven Osteoklast ist innerhalb der Basalmembran auch noch ein vierter Bereich, die so genannte apikale Oberfläche, vorzufinden [Väänänen, 1996].

Osteoklasten beherrschen eine extrem effiziente Methode zur Desintegration des Knochengewebes. Zuerst heften sie sich an die Knochenoberfläche an und bilden einen versiegelten Raum zwischen Zell- und Knochenoberfläche. Danach siedeln sich die zytoplasmatischen Endosome, die die Protonpumpen enthalten, in der Nähe der Knochenoberfläche an und bauen sich in die Zellmembran ein. Ferner wird der Bürstensaum ausgebildet und die Protonpumpen fangen an die Protonen in das versiegelte Areal zu transportieren. Nachfolgend sinkt der pH-Wert in dieser abgeschirmten Region von 7,0 auf ca. 4,0. Das saure Milieu löst die Mineralstoffe des Knochens auf, der organische Anteil der Knochenmatrix wird durch die von Osteoklasten sekretierten Kollagenasen, Proteasen und Hydrolasen abgebaut. Fragmente der zerstörten Knochenmatrix werden von den Osteoklasten resorbiert und in den zytoplasmatischen Vakuolen zersetzt. Nachdem die Knochenresorption beendet ist, können die Osteoklasten zurück in mononukleare Zellen dissoziieren [Buckwalter et al., 1995a; Suda et al., 1996; Väänänen, 1996].

#### 1.1.5.5 Mesenchymale Stammzellen

Das Knochenmark stellt eine heterogene Zellpopulation dar und lässt sich in zwei verschiedenartige, sich jedoch stark reziprok beeinflussende Einheiten unterteilen: das hämatopoetische System und das bindegewebeartige Stroma (bone marrow stroma), in dem die hämatopoetischen Zellen proliferieren, differenzieren und reifen.

Mesenchymale Stammzellen (MSC), die auch als stromale Stammzellen bezeichnet werden, sind Abkömmlinge des Knochenmarks-Stroma [Triffitt, 1996]. Sie wurden von Friedenstein identifiziert, der als Erster feststellte, dass das Knochenmark neben den bereits bekannten Blutstammzellen gleichzeitig noch einen anderen Verband von Stammzellen enthält [Friedenstein et al., 1976]. Nach der Knochenmarksentnahme bei einer Maus überführte er die Gesamtheit der Zellen in Kulturgefäße mit Medium, das mit fötalem bovinem Serum (FBS) angereichert wurde, und beobachtete, dass ein geringer Anteil der entnommenen Zellen schon nach vierstündiger Inkubation die Tendenz aufwies sich an die Plastikoberfläche der Kulturgefäße anzuheften. Er entfernte die nicht adhärente Fraktion der Zellen und berichtete ferner, dass die meisten an die Oberfläche haftenden Zellen einen fibroblastoiden Phänotyp aufweisen und kleine Gruppen von 2-4 Zellen bilden. Nach

einer Ruhezeit von einigen Tagen fingen die Zellen dieser Gruppen an sich stark zu vermehren und Einzelkolonien (Colony Forming Units-Fibroblast (CFU-F)) zu bilden, aus denen nachfolgend Fibroblasten, Knochen- und Knorpelzellen entstanden. Diese Beobachtung wurde in der Folgezeit von vielen anderen Wissenschaftlern bestätigt. Es wurde auch nachgewiesen, dass die nach Friedensteins relativ einfacher Methode isolierten Knochenmarkszellen multipotent sind, d.h. unter geeigneten Kultivierungsbedingungen aus CFU-F nicht nur Fibroblasten, Knochen- und Knorpel-, sondern auch Fett-, Muskel-, Herzmuskel-, Endothelial- und sogar Nervenzellen ausdifferenzieren können [Owen, 1988; Beresford, 1989; Grigoriadis et al., 1988; Bruder et al., 1997; Pittenger et al., 1999; Prockop, 1997; Bianco et al., 2001; Caplan & Bruder 2001; Fukuda, 2003; Roufosse et al., 2004; Oswald et al., 2004].

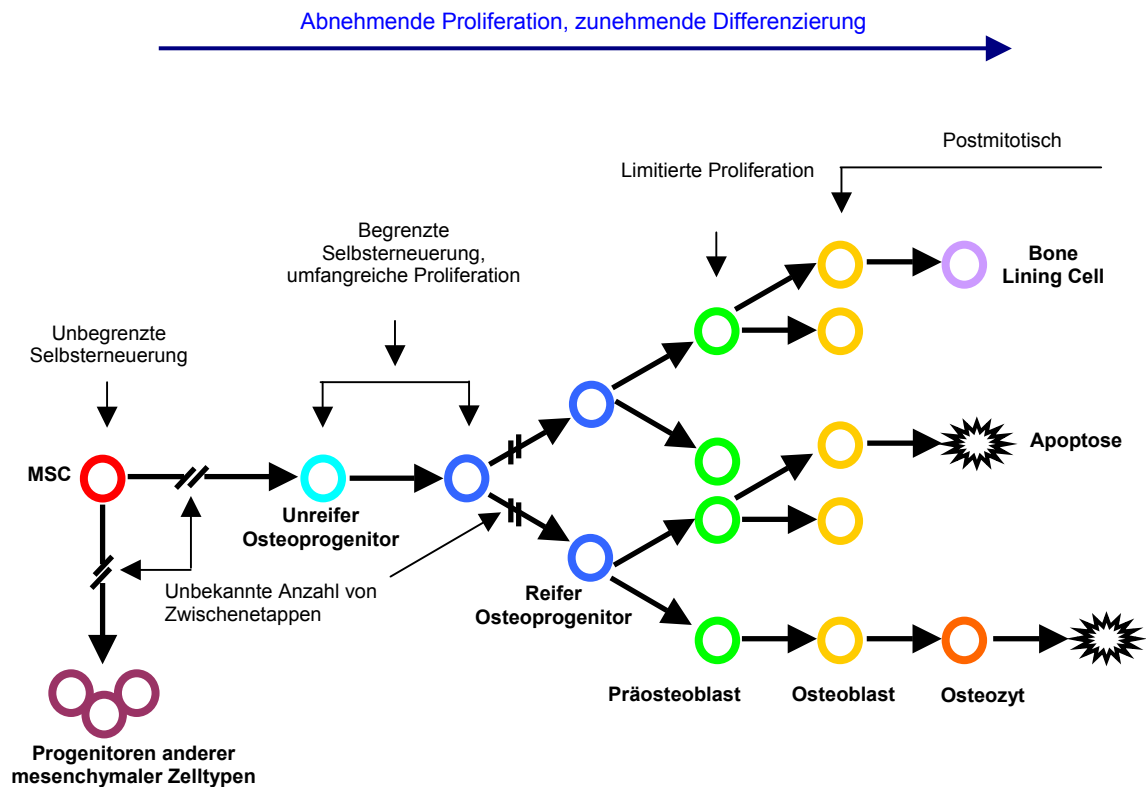
Diese Fraktion der Knochenmarkszellen mesodermalen Ursprungs, die neben der Multipotenz auch ein beträchtliches Potential zur Selbsterneuerung aufweist, und sich sowohl funktionell als auch durch die Oberflächenmerkmale von Blutstammzellen unterscheidet, wird als mesenchymale Stammzellen bezeichnet.

Heutzutage ist es bekannt, dass nicht nur das Knochenmarks-Stroma, das die wichtigste Quelle der MSC darstellt, sondern auch viele anderen Gewebetypen mesenchymaler Herkunft, (z.B. Muskel, Knorpel, Fett, neuronales Gewebe, Sehnen und Bänder) neben den primitiven gewebespezifischen, den so genannten mesenchymalen Vorläuferzellen (mesenchymal precursor cells (MPC)), auch eine sehr geringe Anzahl multipotenter MSC beherbergen. Beide Zellpopulationen regenerieren das Gewebe nach einem Trauma, bei einer Krankheit oder bei Alterungsprozessen [Punzel & Ho, 2002; Roufosse et al., 2004; Barry & Murphy 2004]. Interessant ist, dass die MPC, die überwiegend als gewebespezifische Vorläuferzellen wirken, unter definierten Bedingungen in die Vorläuferzellen anderer Zelltypen transdifferenzieren können. So können z.B. die Knochenvorläuferzellen nicht nur aus den MSC des Knochenmarks, sondern u. a. auch aus im Muskelgewebe, Fettgewebe, Knorpelgewebe oder in perivaskulärem Gewebe vorzufindenden MPC entstehen [Aubin, 1998b; Nuttal et al., 1998; Park et al., 1999; Levy et al., 2001; Minguell et al., 2001; Zuk et al., 2001]. Derzeit ist noch nicht eingehend geklärt, welche Signale für die Umprogrammierung der Stammzellen zum gewünschten Zielgewebe verantwortlich sind und woher diese Signale kommen. Womöglich erkennen die adulten Stammzellen selbst den Ort, wo sie gebraucht werden. Dabei stellt die Blutbahn eine Brücke dar, die die Quellen von Stammzellen und das zu regenerierende Gewebe verbindet [Orlic et al., 2001; Punzel & Ho, 2002; Roufosse et al., 2004].

#### **1.1.5.6 Knochenvorläuferzellen und die osteogene Differenzierung**

Die Osteogenese ist ein komplizierter Prozess, der sowohl das Rekrutieren osteogener Vorläuferzellen als auch ihre allmähliche Umwandlung in voll funktionierende reife Knochenzellen unter dem Einfluss von systemischen und lokalen Faktoren beinhaltet

[Marie, 2002]. Die Entstehung der knochenbildenden Zellen aus den MSC findet nicht nur während der embryonalen Entwicklung, sondern auch im adulten Organismus während des kontinuierlichen Knochenumbaus und nach einer Knochenfraktur statt. Die fließend ablaufende Differenzierung einer MSC zu einer gewebespezifischen, hochspezialisierten Knochenzelle kann in mehrere, postulierte Etappen unterteilt werden (Abb. 1.6) [Triffitt, 1996; Aubin, 1998a; Aubin, 2001; Roufossee et al., 2004].



**Abb. 1.6**

Die Etappen der osteogenen Differenzierung und die Zusammenhänge zwischen Zellproliferation und Zelldifferenzierung [adaptiert aus Aubin, 2000].

Zuerst entstehen aus den multipotenten MSC Progenitorzellen, die in ihrer Potenz bemerkbar begrenzter als die MSC sind. Diese Zellen sind oft tri- oder bipotent, d.h. sie können sich zu Vorläuferzellen von zwei oder drei anderen Zelltypen weiterentwickeln. Aus diesen multipotenten Vorläuferzellen entspringen später Progenitorzellen, deren weiterer Entwicklungsweg schon fest determiniert ist - darunter auch unreife Osteoprogenitorzellen, die anschließend erst in reife Osteoprogenitorzellen, danach in Präosteoblasten und reife Osteoblasten ausdifferenzieren. In vivo wandeln sich nur 10-20 % der reifen Osteoblasten in Osteozyten und Bone Lining Cells um [Nijwede et al., 1996; Aubin, 1998a]. Bis jetzt ist nicht eindeutig geklärt, was im Körper mit dem restlichen Teil der voll ausdifferenzierten Osteoblasten geschieht. Offensichtlich unterliegen sie der Apoptose [Lynch et al., 1998]. Die Zellen der einzelnen Entwicklungsstadien unterscheiden sich nicht nur in Bezug auf ihre proliferative Kapazität, sondern auch morphologisch und teilweise biochemisch.



Im Vergleich zu MSC, die zu fast unbegrenzter Selbsterneuerung und Vermehrung fähig sind, besitzen die Progenitorzellen eine beschränkte Selbsterneuerungs- und Proliferationskapazität. Die zum nächsten Entwicklungsstadium gehörenden Präosteoblasten sind nur noch bedingt teilungsfähig und reife Osteoblasten haben, gleich wie Osteozyten, ihre Teilungskraft komplett verloren.

**Tabelle 1.1**

**Expression der wichtigsten biochemischen Marker in den postulierten Etappen osteogener Differenzierung**

[adaptiert aus Stein et al., 1996; Aubin, 1996; Aubin, 2001]

Marker	Unreifer Osteoprogenitor	Reifer Osteoprogenitor	Präosteoblast	Osteoblast	Osteozyt
<b>ALP</b>	-	+	++	+++	-
<b>Kollagen I</b>	+	++	++	++	+/-
<b>FN</b>	?	?	- → +++	- → +++	+
<b>BSP</b>	++	-	- → +++	- → +++	- → +++
<b>OP</b>	+/-	+/-	- → +	- → +++	- → +++
<b>OC</b>	-	-	-	- → +++	?
<b>PTH/PTHrP-Rezeptor</b>	-	+/-	+++	+++	++

- = Marker wird nicht exprimiert;

+/-, +, ++, +++ = Marker wird schwach bis sehr stark exprimiert;

- → +++ = Marker wird in phänotypisch gleichen Zellen unterschiedlich stark exprimiert,;

? = widersprüchliche Angaben.

Da die In-vitro-Kulturen der Knochenvorläuferzellen meist eine Mischung nicht nur aus unterschiedlich weit ausdifferenzierten Vorläuferzellen und reifen Knochenzellen, sondern auch aus unterschiedlichen Zelltypen darstellen, hat sich eine präzise biochemische Charakterisierung der einzelnen Etappen osteogener Differenzierung als äußerst kompliziert erwiesen. Trotz der Widersprüchlichkeit der aus verschiedenen Forschungslabors stammenden experimentellen Ergebnisse, wurde eine Anzahl grundlegender immunologischer und biochemischer Marker identifiziert, die eine Fortentwicklung der Knochenvorläuferzellen kennzeichnen (Tab. 1.1).

Biochemisch am besten charakterisiert ist der Phänotyp von reifen, metabolisch äußerst aktiven Osteoblasten. Die Osteoblasten stellen Zellen dar, die nicht nur zwei der wichtigsten Marker fortschreitender osteogener Differenzierung, die nicht-gewebespezifische membrangebundene alkalische Phosphatase (ALP) und Kollagen I, sondern auch ein breites Spektrum von nichtkollagenösen Matrixproteinen synthetisieren. Zu dieser Gruppe der Makromoleküle gehören z.B. Osteocalcin (OC), Knochen-

Sialoprotein (bone sialoprotein (BSP)), Osteopontin (OP), Osteonectin (ON), Fibronectin (FN), CD44, Biglycan sowie Decorin. Auf der Zelloberfläche der Osteoblasten findet man zahlreiche Rezeptoren, die eine Bindung von Hormonen (z.B. von Parathormon, Estrogen) und Wachstumsfaktoren (z.B. von PDGF-BB, TGF- $\beta$ 1, IGF-I, BMP-2, FGF-2) sowie die Adhäsion der Zellen an die ECM und Zell-Zell-Kontakte gewährleisten [Aubin & Liu, 1996; Aubin, 2001; Bennett et al., 2001; Szczesny, 2002; Mackie, 2003].

Es ist eindeutig nachgewiesen, dass auch reife Osteoprogenitoren und Präosteoblasten ALP und das wichtigste Protein der Extrazellulärmatrix, Kollagen I, synthetisieren. Präosteoblasten exprimieren ebenfalls Osteopontin und Knochen-Sialoprotein, wenn auch in geringerem Maße als Osteoblasten. Osteocalcin, das stark im postmitotischen, osteoblastären Entwicklungsstadium gebildet wird, ist bei Präosteoblasten noch nicht detektierbar. Bis jetzt nicht genauer geklärt ist die Bedeutung der transienten Expression von Knochen-Sialoprotein im Stadium von unreifen, noch stark proliferierenden Osteoprogenitoren. Womöglich spielt dieses nichtkollagenöse Matrixprotein eine entscheidende Rolle gerade bei der Entfaltung der Osteoblastenentwicklung [Malaval et al., 1999; Aubin, 2001].

Bei Osteozyten, die metabolisch vergleichsweise viel inaktiver sind, ist nur die Expression von Knochen-Sialoprotein und Osteopontin zweifelsfrei nachgewiesen. Womöglich sind sie auch in der Lage kleine Mengen von Kollagen I und Osteocalcin zu synthetisieren.

Mehrere In-vitro- und In-vivo-Studien zeigen jedoch, dass die Osteoblasten, Präosteoblasten und Osteozyten keine homogenen Zellpopulationen darstellen und dass im Knochengewebe, gleich wie in einer In-vitro-Kultur, Osteoblasten, Präosteoblasten und Osteozyten mit sehr unterschiedlichen Expressionsprofilen vorzufinden sind [Liu et al., 1997; Aubin, 2000; Candelieri et al., 2001; Aubin, 2001]. Bei den Osteoblasten sind z.B. nur drei der Differenzierungsmarker - ALP, Kollagen I und der Rezeptor des Parathormons (PTH/PTHrP-Rezeptor) - immer und in relativ gleicher Höhe exprimiert vorzufinden. Der weitaus größere Teil der Markerproteine wird dagegen unterschiedlich stark gebildet, abhängig vom Reifestadium der Osteoblasten, deren Position im Knochengewebe oder dem unmittelbaren Mikromilieu. Die physiologische Bedeutung und die Ursachen der Plastizität des Osteoblasten-Phänotyps sind bis heute noch nicht genauer geklärt. Es ist denkbar, dass die Reifung einer Knochenzelle stark von ihrem Standort innerhalb des Knochengewebes abhängig ist und dass phänotypisch gleiche Zellen nicht immer auch funktionell identisch sind.

Eine sichere biochemische Charakterisierung der ganz frühen Osteoprogenitorzellen ist noch problematischer. Deswegen wurde im Laufe der 90er Jahre eine Vielfalt mehr oder weniger erfolgreich einsetzbarer monoklonaler Antikörper entwickelt, die an die entsprechenden Epitope auf der Zelloberfläche von MSC (Sca-1, STRO-1, SH2, SH3, SH4) oder Knochenvorläuferzellen (SB-10, SB-20, SB-21, HOP-26) anbinden und so deren Bestimmung mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermöglichen [Triffitt et al., 1996; Aubin, 1996;

**Bruder et al., 1997a; Joyner et al., 1997; Barry & Murphy, 2004]**. Die Bedeutung oben genannter und noch weiterer wichtiger Marker der osteogenen Differenzierung wird ausführlicher im Abschnitt 1.2 diskutiert.

Wie schon erwähnt, liegt im adultem Organismus das Reservoir der zu osteogener Differenzierung befähigten Zellen nicht nur im Knochenmark. Fast alle Oberflächen des Knochengewebes enthalten einzelne, an Progenitorzellen reiche Regionen und entsprechend können die Knochenvorläuferzellen auch aus dem Periosteum, Endosteum und der Spongiosa des Knochens isoliert werden **[Sottile et al., 2002]**. Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass auch Fett-, Muskelgewebe, Gelenkhaut (Synovium), peripheres Blut, Nabelschnurblut und sogar das Gewebe der Nabelschnur Progenitorzellen mit osteogenem Potential enthalten **[Chesney & Bucala, 2000; Erices et al., 2000; Schauenstein et al., 2003; Barry & Murphy, 2004; Roufosse et al., 2004; Chen et al., 2004; Sarugaser et al., 2005]**. Auch die in Blutgefäßen anzutreffenden Perizyten stellen ein Depot von zur Osteogenese befähigten Zellen dar **[Triffitt, 1996; Canfield et al., 2000]**.

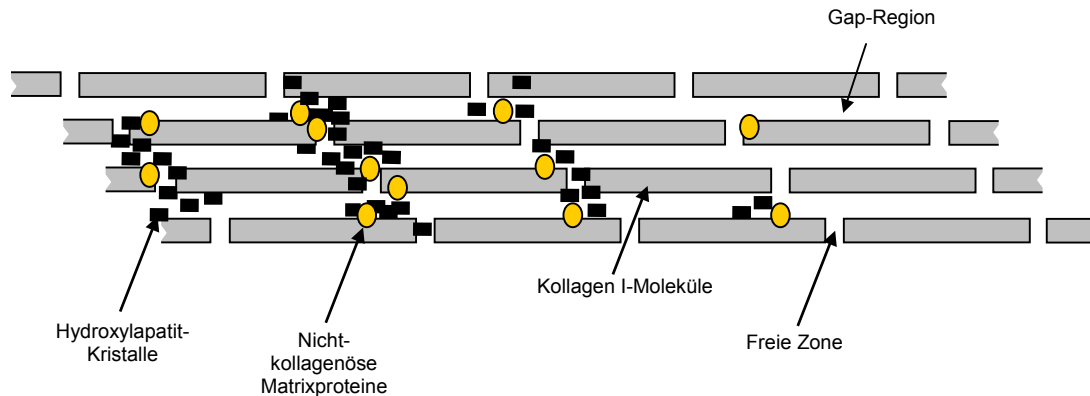
Einerseits eröffnen diese in den letzten Jahren erworbenen Kenntnisse erstmalige Möglichkeiten, die nicht nur für die Grundlagenforschung, sondern auch für das Tissue Engineering und die Transplantationsmedizin bedeutend sind. Andererseits zeigen sie, wie schwierig jedoch eine exakte Klassifizierung und Identifizierung adultem Stammzellen ist und wie vielfältig und komplex die Differenzierungswege während einer Geweberegeneration organisiert sind.

### **1.1.6 Extrazelluläre Matrix des Knochengewebes**

Im Knochengewebe nimmt die extrazelluläre Matrix (ECM) bis zu 90 % des Gesamtvolumens ein. Sie ist ein Komposit, das zu 60-70 % aus anorganischem Material, zu 30-40 % aus organischer Substanz und zu ca. 10 % aus Wasser besteht. Die anorganische Komponente verleiht dem Knochen Härte und Druckfestigkeit, der organische Teil (Proteine und Lipide) gewährleistet Elastizität und Biegsamkeit. Die Proportionen der grundlegenden Komponenten können abhängig von Alter und metabolischem Status des Knochens variieren. Der wichtigste mineralische Bestandteil der Knochenmatrix ist Calciumphosphat hauptsächlich in Form von kristallinem Hydroxylapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). In der Matrix sind jedoch auch Spuren von K, Na, F, Mg, Cl, Fe, Zn, Cu, Al, Pb, Si, B, Sr zu finden.

Der Großteil (ca. 80-90 %) der organischen Komponente besteht aus Kollagen I. Außer Kollagen I sind in der extrazellulären Matrix auch andere Kollagentypen - Kollagen III, Kollagen V und Kollagen XII vertreten **[Buckwalter et al., 1995a; Robey, 1996; Gronthos et al., 1997; Sodek & Cheifetz, 2000]**. Die restlichen ca. 10 % des organischen Anteils formen die so genannten nichtkollagenösen Proteine - Proteoglycane, Glycoproteine und Gla-Proteine. Diese Gruppe von Makromolekülen wurde erst 1981 detaillierter von Termine und seinen Kollegen beschrieben. Sie beobachteten, dass nach selektiver Entfernung

spezifischer Matrixproteine das Knochengewebe die Fähigkeit zu weiterer Mineraleinlagerung verliert und postulierten, dass diese Proteine offensichtlich für die Mineralisierung des Knochengewebes verantwortlich sind. Heutzutage ist bekannt, dass nichtkollagenöse Proteine ebenfalls an der Organisation der ECM, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt sind (siehe Abschnitt 1.2.3.3).



**Abb. 1.7**

**Schematische Darstellung der Verteilung von Kollagen-Molekülen, nichtkollagenösen Matrixproteinen und Hydroxylapatit-Kristallen innerhalb eines Fragments der Kollagenfibrille in der Anfangsphase der Mineraleinlagerung** [adaptiert aus Boskey & Paschalis, 2000].

In mineralisierter Matrix sind die flachen, dünnen, nah aneinander liegenden Hydroxylapatit-Kristalle parallel zu den Kollagenfibrillen angeordnet. Ihre Bildung fängt in den freien Zonen zwischen den Kollagenmolekülen an (Abb. 1.7) und wird von nichtkollagenösen Proteinen (z.B. Knochen-Sialoprotein, Osteonectin, Biglycan), den so genannten Nukleatoren, initiiert [Boskey, 1998]. Diese Proteine werden in der Regel von Osteoblasten und Knochenvorläuferzellen schon vor dem Anfang des Mineralisierungsprozesses synthetisiert. Andere nichtkollagenöse Proteine (z.B. Osteocalcin, Matrix-Gla-Protein), deren Expression nach dem Beginn der Mineralisierung erfolgt, regulieren das Wachstum, die Größe und den Umbau der Kristalle [Boskey & Paschalis, 2000]. Die Höhe der gebildeten Kristalle überschreitet selten 5 nm, dagegen kann ihre Länge sogar 80 nm erreichen.

Die ECM des Knochengewebes spielt nicht nur als Reservoir für Calcium und Phosphor eine bedeutende Rolle. In den engen Spalten zwischen den Mineralkristallen werden Wasser und organische Makromoleküle - Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, Enzyme, matrixabbauende Enzyme (z.B. Metalloproteasen), deren Inhibitoren sowie Phospholipide und Serumproteine (z.B. Albumin,  $\alpha_2$ -HS-Glycoproteine (Fetuin), Immunglobuline und nicht im Knochengewebe synthetisiertes Fibronectin) eingelagert. Das Knochengewebe ist das wichtigste Depot von Zytokinen der TGF- $\beta$ -Familie im Körper [Heinegård & Oldberg, 1989; Buckwalter et al., 1995a; Robey, 1996; Szczesny, 2002].

Zwischen der ECM und den einzelnen Zellen besteht eine feste strukturell-funktionelle Beziehung, die als „dynamic reciprocity“ bezeichnet wird. Über Zelloberflächenrezeptoren, die transmembranen Integrine, die in Knochenzellen reichlich vertreten sind, werden die

von Knochenmatrix kommenden Signale in das Zytoplasma weitergeleitet. Dort lösen sie Signalkaskaden aus, die die Genexpression im Zellkern steuern. Über diese interaktive Verbindung werden nicht nur Proliferation, Differenzierung, Dedifferenzierung, Adhäsion, Migration und Apoptose der Zellen dirigiert, sondern reziprok dazu auch die Synthese oder der Abbau der ECM beeinflusst. Eine besondere Bedeutung haben dabei die von osteogenen Zellen sekretierten Metalloproteasen (z.B. Kollagenasen, Gelatinasen), die ECM abbauen und dadurch Raum für die Einfügung neu synthetisierter Matrixproteine schaffen.

## **1.2 Kultivierung osteogener Zellen und die Knochenbildung in vitro**

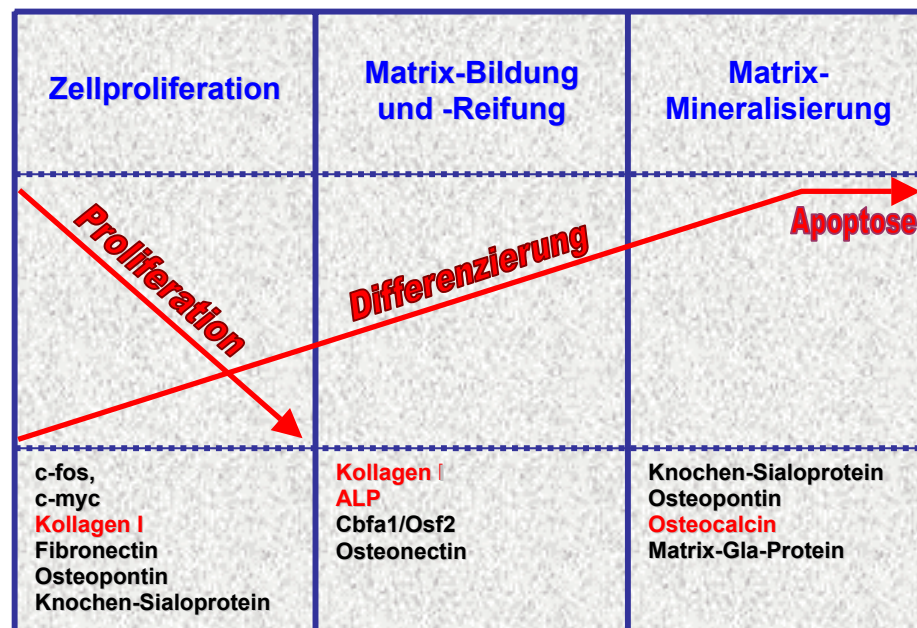
Eine der ersten Beschreibungen der In-vitro-Kultur von Knochenzellen einer Ratte stammt bereits aus dem Jahre 1964 [Peck et al., 1964], eine erste zuverlässige Charakterisierung humaner osteogener Zellen aus dem Jahre 1985 [Robey & Termine, 1985]. Auch wenn eine In-vitro-Kultur von Knochengewebe nicht direkt mit dem viel komplexeren In-vivo-Status vergleichbar ist, stellt sie inzwischen ein relativ einfaches und leicht zugängliches Modell zur Untersuchung der Differenzierung, der Genregulation und des Metabolismus von Knochenzellen dar. Im Rahmen von Fragestellungen des Tissue Engineerings werden mit Hilfe der In-vitro-Kulturen die Kompatibilität von neuen Biomaterialien, der Einfluss von physikalischen und mechanischen Stressfaktoren sowie die Wirkung unterschiedlicher Wachstums-, Differenzierungsfaktoren und anderer biologisch aktiver Substanzen geklärt.

### **1.2.1 Phasen der Osteogenese in vitro**

Die Differenzierung von Knochenzellen ist mit dem Prozess der Osteogenese gekoppelt; in vitro lässt er sich in drei Phasen einteilen: (1) Proliferation der osteogenen Zellen, (2) Bildung und Reifung der ECM sowie (3) Mineralisierung der ECM [Stein et al., 1996; Aubin, 2000]. In vivo ist die proliferative Aktivität osteogener Zellen stark eingeschränkt und wird nur in den Bereichen des Knochenumbaus oder der Regeneration in begrenztem Umfang beobachtet. Die Isolation und die Überführung von Knochenvorläuferzellen in eine In-vitro-Kultur initiiert zu Beginn ein exponentielles Wachstum der Zellpopulation, wobei in vitro, gleich wie in vivo, zwischen Proliferation und Differenzierung der osteogenen Zellen ein komplizierter, funktionell-reziproker Zusammenhang besteht (Abb. 1.8).

Während der Proliferationsphase ist die Aktivität der allermeisten knochenspezifischen Gene stark unterdrückt. Eine Ausnahme bilden Kollagen I und Fibronectin, die auch von mitotisch aktiven Osteoprogenitoren synthetisiert werden. Die ansteigende Ausbildung der Kollagen I-Fibronectin-Matrix führt zu allmählicher Suppression der Zellproliferation und aktiviert Gene, die entscheidend für die Reifung der ECM sind. Die anknüpfend eintretende Mineralisierung der ECM verringert wiederum die Expression der Proteine, die für die Matrix-Reifung zuständig sind, und fördert die Synthese von Osteocalcin. In den

3D-Knötchen (Nodules) ausgereifter und mineralisierter Knochenmatrix werden abschließend Apoptose, Knochenumbau und damit verbundene kompensatorische Zellproliferation beobachtet [Owen et al., 1990; Stein et al., 1996].



**Abb. 1.8**

Schematische Darstellung der drei Phasen der Osteogenese in vitro und des reziproken Zusammenhangs zwischen Zellproliferation und Differenzierung. In der unteren Zeile sind in logischer Reihenfolge die wichtigsten, für jede Phase typischen Differenzierungsmarker aufgelistet. Die rot gekennzeichneten Marker werden in verschiedenen Publikationen am häufigsten erwähnt [adaptiert aus Stein et al., 1996; Aubin, 2000].

Generell ist die Proliferationsphase durch Aktivierung der Proto-Onkogene (c-Fos, c-Myc, c-Jun) und maximale Kollagen I-Expression gekennzeichnet. Die Aktivität von membrangebundener ALP erreicht ihren Höhepunkt während der Matrix-Reifung und sinkt danach mit zunehmender ECM-Mineralisierung. Bei der Osteopontin- und Knochen-Sialoprotein-Expression können dagegen meist zwei Maxima beobachtet werden - das erste während der Proliferationsphase, das zweite zu Beginn der Matrix-Mineralisierung. Der Höchstwert der Osteocalcin-Synthese wird während der Matrix-Mineralisierung erreicht [Stein et al., 1996; Aubin, 2000].

### 1.2.2 Wichtigste Marker der Osteogenese

Osteogene Vorläuferzellen, Osteoblasten und Osteozyten exprimieren also eine Vielfalt von ECM-Proteinen, Zytokinen sowie Zelloberflächenrezeptoren. Wenn auch der Großteil von ihnen nicht unbedingt als knochenspezifisch eingestuft werden kann, sind jedoch die meisten der erwähnten Makromoleküle Kennzeichen (Marker) einzelner Etappen einer fortschreitenden osteogenen Differenzierung. Die bedeutendsten Marker der Osteogenese werden in den nachfolgenden Kapiteln ausführlicher beschrieben und diskutiert.

### 1.2.2.1 Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren bilden ein wichtiges Glied im Netzwerk, das die extrazellulären Stimuli mit dem Mechanismus der Genregulation verkoppelt. Die Expression dieser nuklearen Proteine erfolgt als Antwort auf die Einwirkung physikalischer Stressfaktoren, Wachstumsfaktoren, Zytokine oder Hormone. Danach binden sie an einer fest determinierten, spezifischen Sequenz in der Promotor-Region des Zielgens und wirken so als positiver oder negativer Regulator der Transkription eines Gens. Auf diese Weise werden Wachstum, Differenzierung und Apoptose der Zellen reguliert. In Bezug auf die Osteogenese sind die best untersuchten nuklearen Proteine Cbfa1/Osf2, c-Fos, c-Jun und c-Myc.

Der [Transkriptionsfaktor Cbfa1/Osf2 \(Runx2\)](#) wird vom Cbfa1-Gen, das oft auch als „master gene“ der osteogener Differenzierung bezeichnet wird, kodiert. Neben Cbfa1/Osf2 sind bis jetzt noch zwei andere Isoformen dieses Transkriptionsfaktors - Cbfa1/iso und Cbfa1/orig - identifiziert, deren Rolle im Prozess der Osteogenese noch nicht geklärt ist. Dabei stellt der Cbfa1/Osf2 das vollständige Transkript des Cbfa1-Gens dar [Sodek & Cheifetz, 2000]. Cbfa1/Osf2 ist ein früher und einmaliger Marker der Osteogenese. Während der frühen embryonalen Entwicklung wird Cbfa1/Osf2-Expression in den Mesenchymzellen beobachtet, aus denen nachher Knorpel- und Knochenvorläuferzellen entstehen. In späteren Stadien nimmt die Cbfa1/Osf2 - Expression in den Osteoprogenitorzellen zu; in den Chondrozyten sinkt sie allmählich und wird dann ganz eingestellt [Ducy & Karsenty, 1998; Wagner & Karsenty, 2001]. So werden z.B. Cbfa1-Knock-out-Mäuse mit einem normal vorgeformten jedoch nur aus Knorpelgewebe bestehenden Skelett geboren. Bei ihnen fehlt gleichfalls die Expression von ALP und OC, der typischen osteogenen Marker [Komori et al., 1997; Otto et al., 1997; Sodek & Cheifetz, 2000]. In vivo initiiert die Cbfa1-Überexpression eine ektopische Knochenbildung, In-vitro-Kultur aktiviert sie die Transkription knochenspezifischer Gene in Fibroblasten und Myoblasten [Ducy et al., 1997]. Diese Daten zeigen eindeutig welche Bedeutung das Cbfa1-Gen für die osteogene Differenzierung und die Entwicklung des Knochengewebes hat. Cbfa1/Osf2 reguliert offensichtlich die Transkription vieler mit der osteogenen Differenzierung in Verbindung stehender Gene. Es bindet an der OSE2-Sequenz (osteoblast specific cis-acting element) in der Promotor-Region des Osteocalcin-Gens. Cbfa1/Osf2 bindende Sequenzen wurden auch in  $\alpha 1(I)$ -Kollagen-, BSP- und Osteopontin-Gen identifiziert [Ducy et al., 1997; Sodek & Cheifetz, 2000]. Die Regulation der Aktivität des Cbfa1-Gens erfolgt anscheinend wiederum über andere Transkriptionsfaktoren, z.B. MSX-2 oder Hoxa-2, die von Homeobox-Genen gleichen Namens abgeleitet werden [Ducy et al., 2000]. Während der In-vitro-Osteogenese werden die maximalen Cbfa1/Osf2-Expressionswerte meist während der Phase der Matrix-Reifung erreicht [Sodek & Cheifetz, 2000]. Die Transkription des Cbfa1-Gens kann ebenfalls durch Zugabe von Zytokinen der

TGF- $\beta$ -Superfamilie, von Glucocorticoid Dexamethason oder von Vitamin D3 angeregt werden [Viereck et al., 2002].

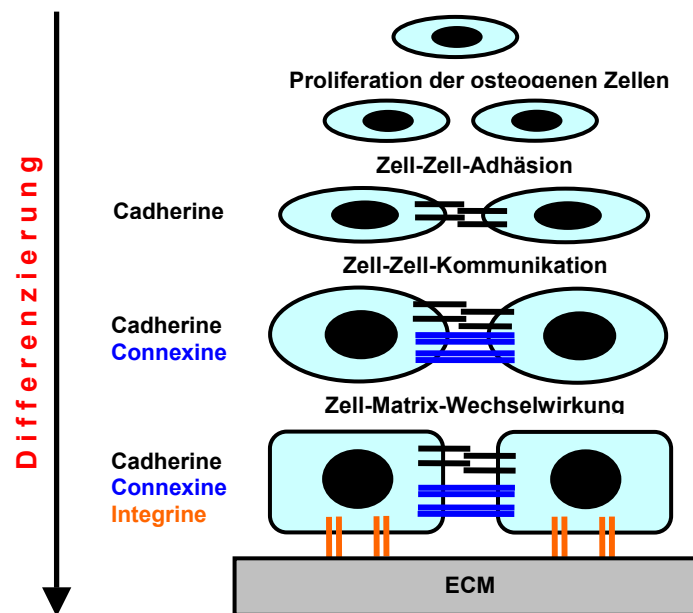
c-Fos, c-Jun, c-Myc sind Phosphoproteine, die von Proto-Onkogenen gleichen Namens verschlüsselt werden. Proto-Onkogene zählen indessen zu den Genfamilien Fos, Jun, Myc, zu denen auch andere Gene (FosB, Fra-1, Fra-2, JunB, JunD, N-Myc, L-Myc) gehören. Für die Entfaltung der biologischen Aktivität der erwähnten nuklearen Proteine ist ihre Dimerisierung mit einem anderen Protein essentiell. So bilden die Phosphoproteine der Fos- und Jun-Genfamilien ein Jun-Fos-Heterodimer, einen so genannten AP-1-Transkriptionsfaktor-Komplex (Aktivierendes Protein-1) aus [Shaulian & Karin, 2002]. Eigentlich verbirgt sich unter dem Begriff AP-1 eine ganze Gruppe verschiedenen Dimere und dementsprechend verschiedener Transkriptionsfaktoren, die an der Sequenz TGA[C/G]TCA (TPA-responsives-Element) in der Promotor-Region des Zielgens anbinden und die Genexpression aktivieren [Grigoriadis et al., 1996]. In ähnlicher Weise bildet c-Myc ein Dimer mit Max, einem Helix-Loop-Helix/Leucin-Zipper-Protein [Schlosser, 2003]. Wenn auch die Zielgene oben genannter Transkriptionsfaktoren und der Mechanismus ihrer Wirkung auf die Genregulation während der osteogenen Differenzierung noch immer nicht detailliert geklärt sind, zeigen jedoch zahlreiche in vivo Experimente mit transgenen Mäusen, dass c-Fos und besonders die Kombination von c-Fos- und c-Jun-Überexpression eine Transformation der Knorpel- und Knochenzellen und die Entstehung von Osteosarkomen hervorrufen. c-Fos-knock-out-Mäuse weisen dagegen einen disbalancierten Knochenumbau und eine abnormale Zunahme der Skelettmasse auf, die mit kompletter Absenz von funktionsfähigen Osteoklasten verbunden ist. Offenbar ist die c-Fos-Expression von besonderer Bedeutung gerade für den Prozess der Osteoklastengenese [Grigoriadis et al., 1995; Grigoriadis et al., 1996; Wagner, 2002]. In vitro werden die c-Myc, c-Jun und c-Fos Phosphoproteine besonders intensiv während der Phase der Zellproliferation synthetisiert, was auf ihre Beteiligung an der Regulation des Zellzyklus hindeutet [Wagner, 2002; Schlosser, 2003]. In den nachfolgenden Phasen der Matrix-Reifung und Mineralisierung wird ihre Expression wieder herunterreguliert. Im Stadium ausgereifter Osteoblasten sind im AP-1-Komplex schon Fra-2 und JunD dominierend [McCabe et al., 1995; Stein et al., 1996; Aubin, 2000; Wagner, 2002].

#### 1.2.2.2 Membran- und Adhäsionsproteine

Außer den Rezeptoren von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die im Kapitel 1.2.2.4 näher erläutert werden, findet man auf der Oberfläche osteogener Zellen zahlreiche transmembrane und membrangebundene Proteine, die Zell-Zell-Kontakte, die Zell-Matrix-Wechselwirkung und die Signalübertragung von der Umgebung zum Kern der jeweiligen Zelle gewährleisten (Abb. 1.9). Diese Interaktionen sind für den Anstoß der Expression gewebespezifischer Gene während der osteogenen Differenzierung besonders wichtig und



werden z.B. über Cadherine, Connexine und Integrine gesichert [Xiao et al., 1998; Marie, 2002]. Die meisten dieser Makromoleküle gehören zu den Familien der Proteoglycane oder der Glycoproteine.



**Abb. 1.9**  
Schematische Darstellung der Entstehung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten während der osteogenen Differenzierung [übernommen aus Marie, 2002].

Cadherine, die der Gruppe der transmembranen Glycoproteine angehören, sind für die homophile Zelladhäsion zuständig. Die extrazellulären Domänen der Cadherine interagieren mit den Cadherin-Molekülen der benachbarten Zellen. Für die Herstellung dieser Verbindung wird die Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  benötigt. Die interzelluläre Domäne ist dagegen über die Proteine der Catenin-Familie indirekt mit dem Zytoskelett der Zelle verknüpft. Osteogene Zellen synthetisieren ein begrenztes Repertoire von Cadherinen – N-Cadherin, E-Cadherin, Cadherin-4 und Cadherin-11 [Cheng et al., 1998; Benett et al., 2001; Marie, 2002]. Angaben über die Dynamik der Expression der jeweiligen Cadherine während der osteogenen Differenzierung sind widersprüchlich und die Bedeutung über Cadherine ausgebildeter Zellkontakte bis jetzt noch nicht endgültig geklärt. Die Verminderung der Cadherin-Expression und ein damit verbundener allmählicher Verlust der Zell-Zell-Adhäsion wird logischerweise beim Übergang der Osteoblasten in das Stadium von Osteozyten oder während der Apoptose der Osteoblasten beobachtet [Jilka et al., 1998; Manolagas, 2000; Kawaguchi et al., 2001; Hunter et al., 2001]. Cadherine und andere Zelladhäsionsmoleküle (z.B. Selektine) wirken synergetisch, wie einige experimentelle Ergebnisse andeuten. Dadurch werden z.B. auch die Entstehung und die Funktion von Connexinen beeinflusst [Rundus et al., 1998; Benett et al., 2001].

Connexine indessen sind Proteine, die an der Ausbildung von Gap junctions, also tunnelähnlichen Verbindungen zwischen den Zellen, beteiligt sind. Bausteine der

Gap junctions sind Connexone (Halbkanäle), die aus 6 Untereinheiten, 6 Connexin(Cx)-Molekülen, bestehen. Die hexagonalen Connexone, die in die Plasmamembran von zwei benachbarten Zellen eingelagert und präzise gegenüber ausgerichtet sind, bilden eine transzelluläre Pore. Sie ermöglicht den Durchfluss von Ionen und Molekülen bis zu 1000 Da Größe (wie, z.B. von cAMP, Glucose-6-phosphat, Nukleotiden) und verkoppelt die anliegenden Zellen nicht nur metabolisch sondern auch elektrisch. Jede Gap junction, die von einigen wenigen bis zu mehreren hundert Connexone beinhalten kann, ist eine dynamische Struktur. Die Connexone, können sich in Abhängigkeit von intra- oder extrazellulären Stimuli schließen oder öffnen. Der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration z.B., oder ein sinkender pH-Wert sind Reize, die ein rasches Zuschließen von Connexonen verursachen. Die Connexin-Superfamilie beinhaltet mindestens 15 verschiedene Proteine, die in einzelnen Gewebetypen spezifisch und ungleich stark exprimiert werden. Dabei besitzen die von unterschiedlichen Connexinen ausgebildeten Gap junctions eine unterschiedliche Permeabilität [Steinberg et al., 1994]. In osteogenen Zellen ist die Expression von Cx45, Cx46 und Cx43 nachgewiesen, wobei die Bildung des Letzten eindeutig überwiegt [Lecanda et al., 2000; Plotkin et al., 2002]. Die Zellkommunikation über die von Cx43 ausgebildeten Gap junctions ist für einen normalen Ablauf der Osteogenese und für die Funktion der osteogenen Zellen entscheidend. So führt der Mangel von Cx43 Expression z.B. zu deutlicher Verzögerung der ECM-Mineralisierung in vivo als auch in vitro [Lecanda et al., 1998, 2000].

Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen werden außerdem über N-glycosylierte transmembrane Proteine der [Integrinfamilie](#) sichergestellt. Jedes Integrin (Integrinrezeptor) ist ein Heterodimer, der aus zwei aneinander kovalent gebundenen Untereinheiten - einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit aufgebaut ist. Die Integrinmoleküle sind in der Zellmembran meist asymmetrisch eingebunden. Sie besitzen eine relativ große extrazelluläre Domäne, die divalente Kationen anlagert und an eine Aminosäuresequenz des jeweiligen Proteins bindet, eine kleine hydrophobe transmembrane Region und eine kurze intrazelluläre Domäne, die mit dem Zytoskelett der Zelle assoziiert ist [Horton et al., 1996; Bennett et al., 2001]. In Säugerzellen wurden bisher 16 homologe  $\alpha$ -, 8 homologe  $\beta$ -Untereinheiten und 22 verschiedene Heterodimere identifiziert [Bennett et al., 2001]. Dabei vermitteln die  $\beta$ 1- und  $\beta$ 3-Einheiten enthaltenden Integrinmoleküle hauptsächlich die Adhäsion der Zellen an die ECM, die  $\beta$ 2 enthaltenden – Zell-Zell-Verbindungen [Minuth et al., 2003]. Die Vielfalt der Heterodimere gewährleistet die Spezifität eines Integrinrezeptors. Einige von ihnen binden an eine einzige, sehr typische Aminosäuresequenz des Proteins, andere können an mehrere unterschiedliche Sequenzen anknüpfen. Viele Integrine binden z.B. an die RGD-Sequenz (Arg(R)-Gly(G)-Asp(D)), wie sie in Molekülen von Kollagen I, Fibronectin, Osteopontin und Knochen-Sialoprotein vorkommt, oder an die GER-Sequenz (Gly(G)-Glu(E)-Arg(R)) in Kollagen I. Die osteogenen Zellen exprimieren ein breites Spektrum der

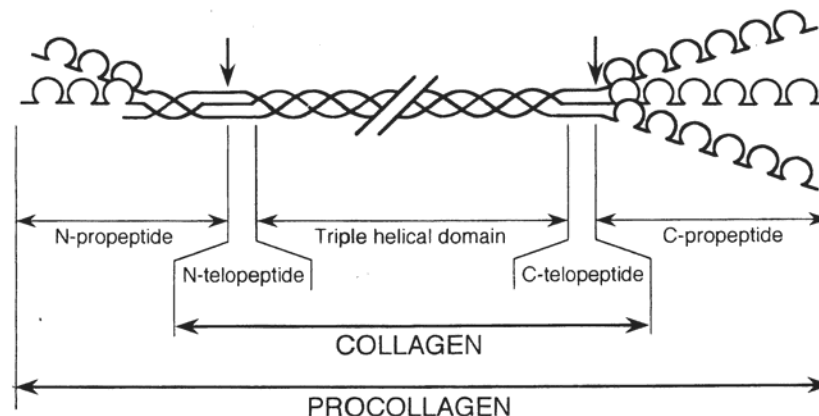
Integrine ( $\alpha 1$ - $\alpha 5$ ,  $\alpha v$ ,  $\beta 1$ - $\beta 5$ ). Dabei stellen die Heterodimere  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$  Kollagenrezeptoren und die Heterodimere  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$  Fibronectinrezeptoren dar. Das Heterodimer  $\alpha 3\beta 1$  bindet sowohl Kollagen I als auch Fibronectin, Laminin, Knochen-Sialoprotein und Osteopontin [Bennett et al., 2001; Gronthos et al., 1997, 2001]. Das Andocken des Ligands an die extrazelluläre Domäne des Integrins löst eine transmembrane Signalkaskade aus und fördert offensichtlich die Expression knochenspezifischer Gene (z.B. Cbfa1) und damit auch den Differenzierungsprozess osteogener Zellen [Xiao et al., 1998]. So führt das Eliminieren der  $\beta 1$ -Untereinheit oder die Deaktivierung von Fibronectinrezeptoren zu einer signifikanten Verringerung der Osteocalcin-Synthese und der Matrix-Mineralisierung [Damsky, 1999; Gronthos et al., 2001]. Neben den Integrinen gibt es auch [transmembrane Proteoglycane](#), die an ECM anheften können. Von ihnen sind in osteogenen Zellen CD44 und Syndecan-1, -2 und -4 nachgewiesen [Benett et al., 2001]. Die extrazellulären Domänen der beiden Proteine enthalten Chondroitinsulfat- und Heparansulfatglycosaminoglycane, die eine Adhäsion der Zellen an die Hyaluronsäure, Kollagen I sowie Fibronectin garantieren. Im Gegensatz zur Integrinbindung ist diese Wechselwirkung nicht von der Gegenwart des Calciums abhängig. Da CD44 ausschließlich in MSC und Osteozyten exprimiert wird [Nijweide et al., 1996; Benett et al., 2001; Guo et al., 2001; Wexler et al., 2003; Oswald et al., 2004], gilt es als wichtiger MSC- und Osteozyten-Marker.

Die [nicht-gewebespezifische alkalische Phosphatase \(ALP\)](#) ist an der Ausbildung von Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Verbindungen nicht beteiligt. Dieses Ektoenzym gilt jedoch als einer der wichtigsten Marker der osteogenen Differenzierung. ALP ist ein membrangebundenes Glycoprotein, das über einen Phosphatidylinositol(PI)-Phospholipid-Komplex kovalent in der Zellmembran verankert wird und durch eine PI-spezifische Phospholipase abgespalten und freigesetzt werden kann. An die Zelloberfläche wird ALP als Homotetramer gebunden; nach der Freisetzung nimmt das Enzym jedoch die Form eines Homodimers an [Aubin & Liu, 1996; Henthorn, 1996]. Außer im Knochengewebe wird die nicht-gewebespezifische ALP auch in der Leber und in den Nieren gebildet. Ihre Rolle bei der osteogenen Differenzierung ist bis heute nicht endgültig geklärt. Da die Patienten mit ALP-Defizit (Hypophosphatasia) eine schwache Knochenmineralisierung aufweisen und das Blockieren von ALP in vitro zu fehlender Mineraleinlagerung führt, ist sie offensichtlich in den Prozess der ECM-Mineralisierung integriert. Zugleich ist bekannt, dass sich über den PI-Komplex verankerte Proteine häufig in die transmembrane Signalübertragung eingliedern; mehrere tierexperimentelle Daten deuten auf die Beteiligung der ALP an der Regulation von Migration, Proliferation und Differenzierung der osteogenen Zellen hin [Hui et al., 1993; Aubin, 2000]. Generell kündigt die ALP-Expression den Übergang der Osteoprogenitorzellen in ein reiferes Entwicklungsstadium an. In vitro wird die maximale ALP-Aktivität meist in der Phase der Matrix-Reifung erfasst [Stein et al., 1996; Aubin, 2000].

### 1.2.2.3 Proteine der extrazellulären Matrix

Die Proteine der ECM sind bewährte Marker bei der osteogenen Differenzierung und charakterisieren besonders gut die Phasen der Matrix-Reifung und -Mineralisierung (siehe auch 1.1.5.6 und 1.1.6). Die Bildung der ECM und die folgenden, über Zelloberflächenrezeptoren verlaufenden, Zell-Matrix-Interaktionen (siehe 1.2.2.2) sind für die Anregung und Regulation der osteogenen Differenzierung von essentieller Bedeutung [Aubin, 2000]. Wie schon erwähnt können die von osteogenen Zellen synthetisierten ECM-Proteine in zwei große Gruppen eingeteilt werden - in Kollagene und in nichtkollagenöse Proteine. Die Tabelle 1.2 gibt einen Überblick über die wichtigsten Gruppen der Matrixproteine und ihre Funktion während der Osteogenese.

Kollagen I stellt die Hauptkomponente des organischen Anteils der Knochenmatrix dar und ist neben dem Knochengewebe auch in anderen, nicht mineralisierten Gewebetypen - in Sehnen, Bändern und in der Haut - reichlich vertreten. Zusammen mit den Kollagenen II, III, V und XI gehört es zur Gruppe der fibrillären Kollagene.



**Abb. 1.10**

**Schematische Darstellung des Aufbaus eines Prokollagen I-Moleküls. Die vertikalen Pfeile markieren die Stellen der Abspaltung von C- und N-terminalen Propeptiden [übernommen aus Rossert & Crombrughe, 1996].**

Die Moleküle dieser Kollagene bestehen aus 3 Untereinheiten, 3 Ketten, die miteinander zu einer typischen Tripelhelix verbunden sind. Für die Entfaltung dieser einzigartigen Struktur sind die Wiederholungen der Aminosäuresequenz Glycin-X-Y in den Ketten der Kollagenmoleküle verantwortlich. In ca. 1/3 der Glycin-X-Y-Wiederholungen ist X ein Prolin und Y ein Hydroxyprolin. Die Gegenwart des Letzten ist für die Stabilisierung der Tripelhelixstruktur ausschlaggebend [Rossert & Crombrughe, 1996]. Hydroxyprolin entsteht bei der Hydroxylierung des Prolins während der Modifikation der einzelnen Kollagenketten im rauen endoplasmatischen Retikulum. An diesem Prozess sind spezifische Hydroxylasen beteiligt, deren Aktivität im Wesentlichen von dem Vorhandensein des Vitamins C abhängig ist.

Die Kollagen I-Moleküle sind überwiegend aus zwei  $\alpha 1$ - und einer  $\alpha 2$ -Kette aufgebaut, nur eine kleine Anzahl aus drei  $\alpha 1$ -Ketten [Rossert & Crombrughe, 1996]. Wie auch bei anderen Kollagentypen fängt die Synthese von Kollagen I innerhalb der Zelle an und wird außerhalb der Zelle endgültig abgeschlossen. Kollagen I wird in der Form des Prokollagens sekretiert (Abb. 1.10). Im extrazellulären Raum werden die N- und C-Telopeptide der Prokollagenmoleküle sofort von spezifischen Proteasen (von Prokollagen-Aminopeptidase und -Carboxypeptidase) zerlegt. Es entsteht ein Tropokollagenmolekül, der Einzelbaustein der Kollagenfibrillen. Die dabei freigesetzten N- und C-terminalen Propeptide beteiligen sich vermutlich interaktiv an der Regulation der weiteren Kollagen-Synthese [Rossert & Crombrughe, 1996]. Außerdem führt ihre Abtrennung zu massiver Verminderung der Löslichkeit von Tropokollagen. Danach lagern sich die einzelnen, nun unlöslichen Tropokollagenmoleküle, um jeweils ein Viertel ihrer Länge verschoben, parallel an (siehe Abb. 1.7) und bilden untereinander kovalente Quervernetzungen aus. Dabei entstehen zuerst kleine Primärfilamente, die sich danach zu Kollagenfibrillen vergrößern. Die Quervernetzungen verleihen den Kollagenfibrillen eine außergewöhnliche Zugfestigkeit und erfolgen über Aldehydgruppen, die durch enzymatische Desaminierung von Lysin und Hydroxylysin entstehen. Die Kollagenfibrillen sind meist heterotypisch aufgebaut. So enthalten die Fibrillen beispielsweise neben dem Kollagen I auch das Kollagen V. Über dieses Mischungsverhältnis wird der Durchmesser der Kollagenfibrillen bestimmt [Sodek & Cheifetz, 2000; Minuth et al., 2003].

Proteoglycane, Glycoproteine und Gla-Proteine gehören zu der Gruppe der nichtkollagenösen Proteine.

In [Proteoglycan](#)-Molekülen wird ein relativ kleines Kernprotein, das ca. nur 5 % von der gesamten Molekülmasse darstellt, kovalent mit langen Polysaccharidseitenketten (Glycosaminoglycanketten) zusammengeknüpft. Dabei können die Polysaccharidketten unterschiedlich stark sulfatiert sein und dementsprechend Chondroitin-, Dermatan-, Keratan- oder Heparansulfat repräsentieren. Die wichtigsten Vertreter dieser Proteingruppe sind Decorin, Biglycan und Fibromodulin, die zu der Familie der leucinreichen Proteoglycane gehören.

[Glycoproteine](#) stellen dagegen Proteine dar, die posttranslational durch das Anhängen von kurzen Oligosaccharidseitenketten modifiziert wurden. Im Gegensatz zu Proteoglycan-Molekülen macht in Glycoproteinen der Saccharidanteil nur 10-25 % der gesamten Molekülmasse aus. Zudem können die Oligosaccharidketten an das Protein auf zwei Arten gebunden sein - N-glycosidisch oder O-glycosidisch. Bei der N-glycosidischen-Bindung werden sie an die freie Aminogruppe von Asparagin angehängt, bei der O-glycosidischen-Bindung an die Hydroxylgruppe von Serin oder Threonin. Zusätzlich können die angehängten Oligosaccharidketten durch das Anknüpfen von Phosphat- oder Sulfatgruppen noch weiter verändert werden. Zu dieser Gruppe der ECM-Proteine gehören

z.B. Fibronectin, Osteonectin, Knochen-Sialoprotein und Osteopontin, wobei die beiden letzten Mitglieder der Sialoprotein-Familie sind.

**Tabelle 1.2**

**Kurze Charakteristik der wichtigsten Proteine der ECM**

[adaptiert aus Heinegård & Oldberg, 1989; Robey, 1996; Butler et al., 1996; Ducy & Karsenty, 1996; Boskey, 1998; Aubin, 2000; Sodek & Cheifetz, 2000]

Protein	Größe und Struktur des Proteins	Funktion des Proteins
<b>Kollagene</b>		
<b>Kollagen I</b>	Tripelhelix, Glycoprotein	Bildet ca. 90 % des organischen Anteils der Knochenmatrix, bindet und orientiert die nichtkollagenösen Proteine der ECM, moduliert Zell-Matrix-Interaktionen.
<b>Kollagen V</b>	Tripelhelix, Glycoprotein	In Knochenmatrix gering vertreten. Zusammen mit Kollagen I bildet heterotypische Fibrillen und bestimmt dadurch den Durchmesser der Kollagenfibrillen.
<b>Nichtkollagenöse Proteine</b>		
<b>Proteoglycane</b>		
<b>Biglycan</b>	~ 270 kDa Enthält zwei Ketten des Chondroitinsulfats, Kernprotein reich an Leucin	Bindet an Kollagen I, reguliert die Entstehung und den Durchmesser von Kollagenfibrillen; bindet an TGF- $\beta$ -Isoformen, moduliert Zell-Matrix-Interaktionen, initiiert die Mineraleinlagerung, reguliert das Wachstum von Hydroxylapatit-Kristallen.
<b>Decorin</b>	~ 130 kDa Enthält eine Kette des Chondroitinsulfats, Kernprotein reich an Leucin	Bindet an Kollagen I, reguliert die Entstehung und den Durchmesser von Kollagenfibrillen, bindet an TGF- $\beta$ -Isoformen und beeinflusst ihre Aktivität, moduliert Zell-Matrix-Interaktionen.
<b>Fibromodulin</b>	~ 57 kDa Enthält eine Kette des Keratansulfats, Kernprotein reich an Leucin	Bindet an Kollagen I, beeinflusst die Entstehung von Kollagenfibrillen
<b>Glycoproteine</b>		
<b>Knochen-Sialoprotein (BSP-II)</b>	~ 46-75 kDa Phosphoryliert, reich an Sialinsäure und Glutaminsäure, enthält RGD-Sequenz und Hydroxylapatit-bindende-Domänen	Bindet an Integrinrezeptoren osteogener Zellen, initiiert die Bildung von Hydroxylapatit-Kristallen, reguliert das Wachstum von Hydroxylapatit-Kristallen.
<b>Osteopontin (BSP-I)</b>	~ 44-75 kDa Phosphoryliert, reich an Sialinsäure und Aspartat, enthält RGD-Sequenz und Hydroxylapatit-bindende-Domänen	Bindet an Integrinrezeptoren osteogener Zellen, inhibiert das Wachstum von Hydroxylapatit-Kristallen und formt die Anbindungsstellen für die Osteoklasten.
<b>Fibronectin</b>	~ 400 kDa Besteht aus zwei ~ 200 kDa großen Untereinheiten, enthält RGD-Sequenz	Bindet an Integrinrezeptoren osteogener Zellen sowie an Kollagen, Fibrin, Heparin und Hydroxylapatit, fördert die Mineraleinlagerung.  Wichtige Serumkomponente. In ECM eingelagertes Fibronectin kann nicht nur endogene, sondern auch exogene Herkunft haben.
<b>Osteonectin</b>	~ 35-45 kDa Phosphoryliert, enthält $\text{Ca}^{2+}$ -bindende-Domänen mit hoher (zwei EF-Hand-Domänen) und niedriger Affinität.	Die Funktion ist nicht endgültig geklärt. Vermittelt (initiiert?) anscheinend die Mineraleinlagerung, reguliert (inhibiert?) das Wachstum von Hydroxylapatit-Kristallen.

<b><math>\gamma</math>-Carboxyglutaminsäure-enthaltende Proteine (Gla-Proteine)</b>		
<b>Osteocalcin</b> (Bone Gla Protein (BGP))	~ 5 kDa enthält drei Gla-Gruppen mit hoher Affinität gegenüber $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Ca}^{2+}$ -enthaltende-Proteine und Hydroxylapatit	Reguliert das Wachstum von Hydroxylapatit-Kristallen (niedrige OC-Konzentrationen wirken fördernd, hohe Konzentrationen inhibierend), beeinflusst die Rekrutierung und Differenzierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen und bildet zusammen mit Osteopontin den Osteocalcin/Osteopontin Komplex.
<b>Matrix-Gla-Protein</b>	~ 15 kDa enthält fünf Gla-Gruppen mit hoher Affinität gegenüber $\text{Ca}^{2+}$ und Hydroxylapatit, sehr schwer löslich.	In Knochenmatrix nur in geringen Konzentrationen anzutreffen, reguliert (inhibiert) das Wachstum von Hydroxylapatit-Kristallen, bindet Zytokine der BMP-Gruppe.

Die Vertreter des nächsten Proteinverbands, die so genannten [Gla-Proteine](#) - Osteocalcin und Matrix-Gla-Protein - sind vergleichsweise klein. Sie enthalten  $\gamma$ -Carboxyglutaminsäure-Gruppen (Gla-Gruppen), die bei der  $\gamma$ -Carboxylierung der Glutaminsäure durch spezifische  $\gamma$ -Carboxylase entstehen und den Proteinen eine sehr hohe Affinität gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$  und Hydroxylapatit verleihen. Für diese enzymatische Reaktion ist die Anwesenheit von Vitamin K als Kofaktor erforderlich.

#### 1.2.2.4 Zytokine

Die osteogenen Zellen synthetisieren und sekretieren in den extrazellulären Raum eine Vielfalt von Zytokinen, d.h. Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, die sowohl autokrin als auch parakrin wirken können. Einige von diesen biologisch aktiven Substanzen (z.B. FGF-2, EGF, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, BMP-2) können an Heparan- oder Chondroitinsulfat enthaltende Proteoglycane binden und in der ECM aufbewahrt werden. In gebundener Form sind sie inaktiv. Erst wenn die Knochenmatrix durch Metalloproteasen aufgelöst wird, z.B. während des Knochenumbaus, können sie ihre biologische Aktivität wieder entfalten. Nach einer Knochenfraktur wirken die in der ECM eingelagerten Wachstums- und Differenzierungsfaktoren stimulierend oder regulierend nicht nur auf osteogene Zellen, sondern auch auf verschiedene andere an dem Regenerationsprozess beteiligte Zellpopulationen. Die wichtigsten Zytokine im Knochengewebe sind die der IGF-, PDGF-, FGF- und TGF- $\beta$ -Familie sowie EGF und Interleukine.

[Insulin-Like Growth Factors](#), IGF-I und IGF-II, sind Polypeptide, die nicht nur eine 50%ige Homologie mit Insulin sondern auch eine ihm ähnliche biologische Aktivität aufweisen. Ein breites Spektrum an Zellen mesenchymaler Herkunft, auch Osteoblasten und Osteoklasten, synthetisieren diese beiden Zytokine [Middleton et al., 1995; Mundy et al., 2001; Szczesny, 2002; Jadlowiec et al., 2003]. Da IGF-I und -II chemisch sehr instabil sind (die Halbwertszeit ihres biologischen Zerfalls entspricht ca. 5 min), werden sie nach der Sekretion an eines von bislang 7 bekannten IGF-bindenden Proteinen (IGFs binding proteins (IGFBPs)), jedoch vorwiegend an IGFBP3, angeknüpft. In Form dieses stabilen Protein-Komplexes werden die IGF-I und -II transportiert oder in ECM eingelagert. Knochenmatrix ist dadurch eines der bedeutendsten Reservoirs von IGF-II im menschlichen



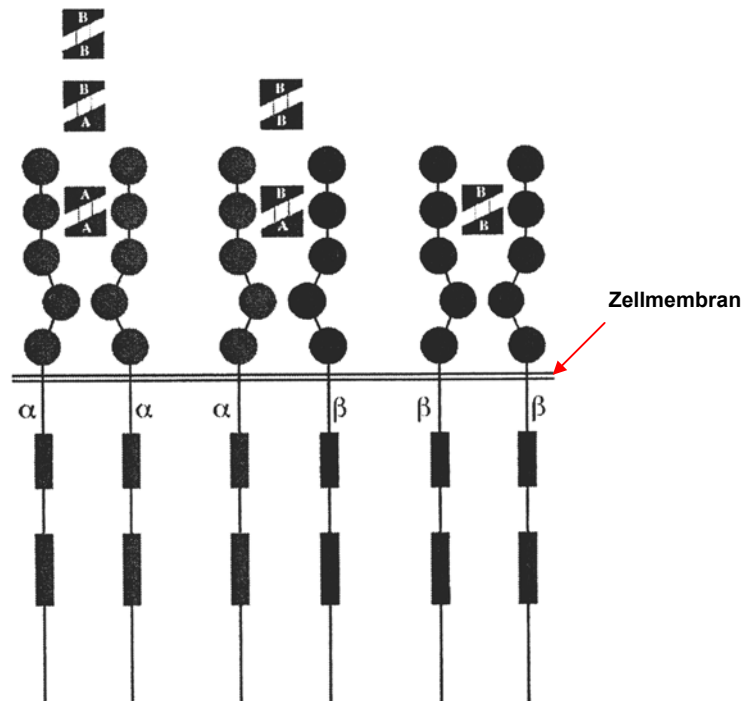
Körper [Szczesny, 2002]. Die Aktivierung dieser Wachstumsfaktoren erfolgt über Proteasen, z.B. MMP-2 und Cathepsin-D, die das bindende Protein abspalten und IGF erneut freisetzen [Xynos et al., 2000]. In vitro stimulieren die IGF-I und -II die Proliferation osteogener Zellen, die Synthese von Kollagen I und inhibieren die Expression der Kollagenasen sowie apoptotische Prozesse [Rossert & Crombrughe, 1996; Mundy et al., 2001; Zhang et al., 2002]. In vivo wurden die höchsten Konzentrationen von IGF in Wachstumszonen des Knochens und in der Frakturspalte während der Knochenregeneration erfasst [Jadlowiec et al., 2003]. Darüber hinaus ist IGF-I offensichtlich auch an der Regulation der Matrixmineralisierung beteiligt [Zhang et al., 2002]. Im Allgemeinen rufen beide IGF-Isoformen gleiche Effekte hervor, sie haben jedoch eine unterschiedliche biologische Aktivität – IGF-I ist ca. 4-7-mal aktiver als IGF-II [Szczesny, 2002].

Es sind zwei IGF bindende Rezeptoren - der Typ-I-Rezeptor und der Typ-II-Rezeptor bekannt. Dabei ist anscheinend nur der Typ-I, ein Tyrosinkinase-Rezeptor, an der Signalübertragung in das Zellinnere beteiligt. Er besteht aus zwei extrazellulären  $\alpha$ -, zwei transmembranen und zwei mit denen verbundenen intrazellulären  $\beta$ -Domänen, in welchen sich eine hoch konservierte tyrosinspezifische Proteinkinase befindet. Nach dem Andocken des Ligands findet eine gegenseitige Autophosphorylierung der  $\beta$ -Domänen statt, die eine Aktivierung der Tyrosinkinase und darauf folgend die Phosphorylierung des Effektorproteins (Insulinrezeptorsubstrats (IRS)) und eine Kaskade weiterer intrazellulärer Reaktionen auslöst. Der Typ-I-Rezeptor besitzt eine stärkere Affinität gegenüber IGF-I als gegenüber IGF-II und kann auch Insulin anbinden. Der Typ-II-Rezeptor ist indessen ein monomeres Glycoprotein, der vorwiegend IGF-II, aber auch IGF-I sowie Mannose-6-Phosphat und Mannose-6-Phosphat-beihaltende-Glycoproteine bindet. Vermutlich ist er an dem Transport des IGF aus dem extrazellulären Raum in die intrazellulären Lysosomen beteiligt und reguliert dadurch deren Aktivität und Konzentration [McCarthy et al., 1998].

[Platelet-Derived Growth Factor](#), PDGF, wurde zuerst in den in der Blutbahn zirkulierenden Thrombozyten entdeckt und aus ihnen isoliert. PDGF ist ein Dimer, das aus zwei mit Disulfid-Brücken verbundenen Polypeptidketten aufgebaut ist. Die A- und B-Polypeptidketten des Wachstumsfaktors sind in ihren Sequenzen zu ca. 60 % identisch und können sich zu Homodimeren PDGF-AA, PDGF-BB oder dem Heterodimer PDGF-AB zusammenschließen. Diese Dimere binden mit unterschiedlicher Affinität an die zwei Tyrosinkinase-Rezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$ . Jeder von ihnen beinhaltet eine extrazelluläre Domäne, die aus fünf Immunoglobulin-Untereinheiten aufgebaut ist, eine transmembrane Domäne und eine intrazelluläre, charakteristisch gegliederte Tyrosinkinase-Domäne (Abb. 1.11). Dabei sind die drei äußeren Immunoglobulin-Untereinheiten in das Anbinden von PDGF involviert, die vierte beteiligt sich an der Rezeptor-Rezeptor-Wechselwirkung. Als Dimer besitzt das PDGF-Molekül zwei receptorspezifische Epitope und kann somit gleichzeitig an zwei Rezeptoren andocken. Dabei schließen die  $\alpha$ -Rezeptoren sowohl A- als auch



B-Ketten, die  $\beta$ -Rezeptoren nur B-Ketten des Wachstumsfaktors an. Daraus resultieren drei mögliche Rezeptor-Kombinationen (Abb. 1.11) [Heldin et al., 1998].



**Abb. 1.11**

Schematische Darstellung der Dimerisierung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren. Nach dem Andocken eines der PDGF-Moleküle entsteht entweder ein homo- oder ein heteromerer Rezeptor-Komplex. Die Kreise stellen die IG-Domänen des Rezeptors, die Rechtecke die charakteristisch gegliederten Tyrosinkinase-Domänen dar [übernommen aus Heldin et al., 1998].

Die Dimerisierung des Rezeptors nach der Ligandenbindung ist ein Schlüsselereignis. Es setzt die beiden Tyrosinkinase-Domänen nebeneinander und führt zu gegenseitiger Autophosphorylierung (Tyrosinphosphorylierung). Diese aktiviert zum einen die rezeptoreigene Tyrosinkinase durch Aufhebung der Autoinhibition, zum anderen schafft sie Anbindungsstellen für die nachgeschalteten Effektorproteine, indem die Phosphotyrosinreste an spezifische Domänen (SH2-, PTB-Domäne) dieser Proteine binden. Nach der Anbindung werden sie von der Tyrosinkinase des Rezeptors phosphoryliert und so aktiviert. Dadurch werden die weiterführenden Reaktionen des Signalübertragungsweges in Gang gesetzt [Beck, 2002].

PDGF hat eine starke mitogene und chemotaktische Wirkung auf viele Zelltypen mesenchymalen Ursprungs. Osteogene Zellen synthetisieren sowohl PDGF-A- als auch PDGF-B-Polypeptidketten und in ihrer Zellmembran sind beide PDGF-Rezeptoren präsent [Zhang et al., 1991; Horner et al., 1996; Kose et al., 1996; Yang et al., 2000]. Im Knochengewebe fördert PDGF nicht nur die Proliferation knochenbildender Zellen und die ECM-Synthese sondern wirkt auch als Chemoattraktant und Regulator des Knochenumbaus. Es ist nachgewiesen, dass auch Osteoklasten PDGF-A synthetisieren, jedoch selbst keine  $\alpha$ -Rezeptoren besitzen [Horner et al., 1996]. Anscheinend hat von Osteoklasten sekretierter PDGF eine chemotaktische Wirkung und fördert die Rekrutierung osteogener Zellen.

Die Angaben über den Expressions- und Wirkungsgrad der einzelnen PDGF-Isoformen im Knochengewebe sind oft widersprüchlich. Offensichtlich rufen sie ähnliche Effekte hervor und die Unterschiede in ihrer spezie- oder gewebespezifischen Aktivität werden zum Teil über eine vorverlegte Expression des einen oder anderen PDGF-Rezeptors reguliert. So ist im fötalen Rattenknochengewebe der  $\beta$ -Rezeptor ca. 10-mal stärker exprimiert als der  $\alpha$ -Rezeptor und dementsprechend hat der PDGF-BB eine viel stärkere Wirkung als die beiden anderen Isoformen des Zytokins. Indessen ist in der Zellmembran humaner osteogener Zellen neben dem  $\beta$ -Rezeptor auch eine relativ große Anzahl des  $\alpha$ -Rezeptors vorzufinden. Daher sind die humanen Zellen sowohl PDGF-AA als auch PDGF-BB und PDGF-AB gegenüber gleichermaßen empfindlich [Horner et al., 1996]. Im humanen Frakturkallus ist die Anwesenheit aller PDGF-Isoformen und der beiden Rezeptoren nachgewiesen [Andrew et al., 1995]. Die öfters beobachtete stärkere Auswirkung von PDGF-BB ist anscheinend damit verbunden, dass diese Isoform alle drei Rezeptorkombinationen hervorrufen und demgemäß effizienter wirken kann.

Fibroblast Growth Factors, FGFs, sind Polypeptide, die die Proliferation und Differenzierung eines breiten Spektrums verschiedenen Zelltypen, auch osteogener Zellen, stark beeinflussen. Zurzeit sind 22 verschiedene FGF-Isoformen und 4 FGF-Tyrosinkinase-Rezeptoren bekannt [Yu et al., 2003]. Die Spezifität der Anbindung dieser Ligandenvielfalt wird über determinierende Sequenzen im extrazellulären Bereich des Rezeptors und über alternative Nebenformen (splice Forms) der Rezeptoren geregelt. Daher sind bei den FGF-Rezeptoren (FGFR) 1, 2 und 3 jeweils zwei gewebespezifische Nebenformen dokumentiert: eine epitheliale Form „b“ und eine mesenchymale Form „c“. FGF-7 und FGF-10 aktivieren z.B. den FGFR2b, FGF-2, -4, -6, -8, -9 - den FGFR2c [Yu et al., 2003]. Wie auch bei allen anderen Tyrosinkinase-Rezeptoren führt das Andocken eines der FGF-Moleküle zur Dimerisierung und Autophosphorylierung des Rezeptors. Abhängig von Gewebetyp und FGF-Isoform können nachfolgend mehrere Signalübertragungswege aktiviert werden. In Osteoblasten werden z.B. die von MAP-Kinasen (ERK, p38-Kinase, Proteinkinase C) vermittelten Signalkaskaden angeregt [Marie, 2003]. Außer an Rezeptoren können die FGF-Isoformen mit viel niedrigerer Affinität auch an transmembrane Proteoglycane, die Heparansulfat enthalten, anheften. Einige von ihnen, Syndecane, sind auch in der Zellmembran osteogener Zellen präsent. Die Bedeutung dieser Wechselwirkung ist bis jetzt nicht endgültig geklärt. Eventuell stellen diese Proteoglycane einen der Mechanismen dar, die die Aktivität von Zytokinen der FGF-Familie auf der Zelloberfläche regulieren. Anscheinend binden sie einen Teil der abgesonderten FGFs und transportieren sie zu den FGF-Rezeptoren, die eine deutlich höhere Affinität besitzen [Mundy et al., 2001]. Welche Bedeutung dem Vorhandensein dieser Vielfalt an FGF-Isoformen zukommt, ist zurzeit noch ebenso unklar wie die genauen Mechanismen der Regulation der FGF-Synthese und -Aktivität. Wenn auch die experimentellen Ergebnisse

verschiedener Forschergruppen oft diskrepanz sind, ist die Wichtigkeit der FGF-Isoformen für einen normalen Ablauf der Osteogenese jedoch unbestritten. Während der embryonalen Entwicklung ist die Expression von FGF-2, FGF-9, FGF-18 sowie FGFR1 und FGFR2 schon in Mesenchymzellen und später in Präosteoblasten und Osteoblasten belegt. So weisen z.B. FGF-2- und FGF-18-knock-out-Mäuse eine Verzögerung in der Entwicklung und Ossifikation von Röhrenknochen sowie eine verminderte Expression knochenspezifischer Marker auf [Marie, 2003]. Auch in vitro sekretieren osteogene Zellen eine Vielzahl von FGF-Isoformen, FGF-1, -2, -4, -9, -18, und exprimieren FGFR1 und FGFR2 [Mansukhani et al., 2000; Mundy et al., 2001; Marie, 2003].

**Tabelle 1.3**

**Durch FGF- 2 regulierte Proteine und Zytokine**

[adaptiert aus Martin et al., 1997; Mansukhani et al., 2000; Debias et al., 2001; Mundy et al., 2001; Marie, 2003]

Transkriptionsfaktoren	ECM- und Membranproteine	Zytokine	ECM abbauende und den Abbau regulierende Proteine
AP-1 ↑ Cbfa/Osf2 ↑	Kollagen I ? OP ↑ BSP ↑ OC ? ALP ↓ N-Cadherin ↑ Connexin-43 ↓	TGF-β-Isoformen ↑ IGF-1 ↑ VEGF ↑ IL-1 ↑ IL-6 ↑	Kollagenase-1 ↑ Kollagenase-3 ↑ Stromelysin-3 ↑ Gewebeinhibitoren der Metalloproteasen ↑

↑ = die Expression wird gefördert; ↓ = Die Expression wird gehemmt; ? = widersprüchliche Angaben.

In Bezug auf die Osteogenese ist von allen bis jetzt bekannten FGF-Isoformen offenbar FGF-2, der auch als basic FGF (bFGF) bezeichnet wird, am ausführlichsten untersucht. Postnatal wird FGF-2 von reifen Osteoblasten produziert und in der ECM eingelagert [Jadlowiec et al., 2003]. FGF-2 hat einen starken Einfluss auf alle Phasen der Osteogenese (siehe Tab.1.3). Er fördert die Proliferation der Knochenvorläuferzellen, beeinflusst Bildung, Mineralisierung und Abbau der ECM und reguliert den Ablauf des programmierten Zelltods [Mundy et al., 2001; Jadlowiec et al., 2003; Marie, 2003]. Dabei kann der Einfluss von FGF-2 direkt, d.h. über sofortige Aktivierung der Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren, oder indirekt über die Regulierung von Genen, die für die Synthese bestimmter Zytokine oder für die Entstehung der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte zuständig sind, erfolgen. Cbfa1 ist z.B. eines der wichtigsten Zielgene des FGF-2/FGFR-Signalweges. Darüber hinaus verringert FGF-2 die Expression von Connexin 43 und erhöht die Expression von N-Cadherin und die TGF-β1-, IGF-1- und VEGF-Synthese [Mansukhani et al., 2000; Marie, 2003]. Ausmaß und Art der von FGF-2 hervorgerufenen Effekte sind sehr stark vom Entwicklungsstadium der Zellen und von der Einwirkungsdauer abhängig. So fördert FGF-2 beispielsweise die Proliferation und inhibiert die Abläufe des programmierten Zelltods in Knochenvorläuferzellen, die sich in sehr frühen Entwicklungsstadien befinden. Im Gegensatz dazu unterstützt FGF-2 die Apoptose in osteogenen Zellen, die schon ein

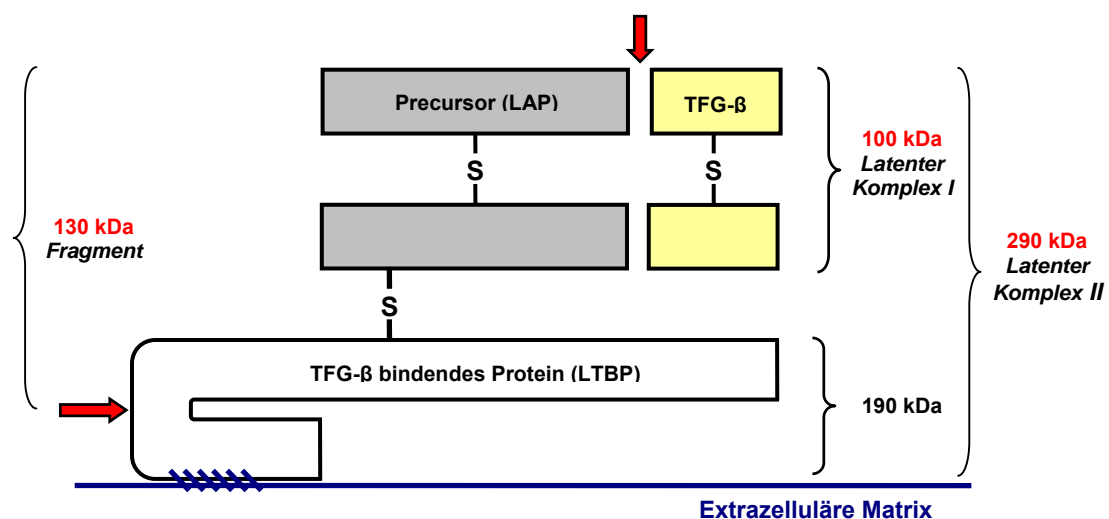
bestimmtes Reifestadium erreicht haben. Analog hierzu führt eine temporäre FGF-2-Einwirkung zur Hemmung apoptotischer Prozesse, eine andauernde hingegen zum Absterben reifer Osteoblasten [Mansukhani et al., 2000; Marie, 2003]. Der Mechanismus und die Bedeutung dieses dualen Effekts sind derzeit noch nicht endgültig geklärt. Eventuell wird auf diese Weise im Körper die Anzahl der osteogenen Zellen, die einer terminalen Differenzierung unterliegen, kontrolliert und dadurch die Knochenbildungsrate bestimmt. Darüber hinaus könnte FGF-2 auch die Erhaltung eines bestimmten Entwicklungsstadiums unterstützen [Martin et al., 1997].

Epidermal Growth Factor, EGF, zählt zu den am frühesten entdeckten Wachstumsfaktoren. Er wurde ursprünglich aus den Submandibulardrüsen männlicher Mäuse isoliert, ist jedoch auch in vielen anderen Gewebetypen und in Körperflüssigkeiten (z.B. Blut, Speichel, Milch, Harn) vorzufinden [Shroff et al., 1996]. Dieser Wachstumsfaktor ist ein Polypeptid, der zur Familie EGF-verwandter-Peptide gehört. Außer EGF, dem bekanntesten Mitglied dieser Peptidfamilie, umfasst sie z.B. auch TGF- $\alpha$ , Amphiregulin, Epiregulin sowie Neuroreguline. Alle diese Polypeptide dienen als Liganden für die Rezeptoren der erbB-Gruppe, einer Subfamilie der Tyrosinkinase-Rezeptoren, zu denen erbB1 (EGFR), erbB2 (c-Neu), erbB3 sowie erbB4 gehören [Moghal & Sternberg, 1999; Chan & Wong, 2000; Wolf, 2001]. Ähnlich wie bei allen anderen Rezeptoren dieses Typs, induziert die Ligandenbindung eine Konformationsänderung innerhalb des Rezeptors, die zur Ausbildung von Rezeptor-Dimeren und zur Autophosphorylierung führt. Dadurch werden bestimmte Signalübertragungswege aktiviert, nach der EGF-Bindung z.B. der JAK-STAT- oder RAS-MAP-Kinase-Weg [Yoneda, 1996]. Zurzeit sind 10 verschiedene erbB-Dimere bekannt, die sich jedoch in ihrer Stabilität und Potenz, Signale auszulösen oder einen bestimmten Liganden zu binden, unterscheiden. Diese funktionelle Vielfalt ist für die Gewährleistung der Spezifität und für die Verteilung biologischer Signale von großer Bedeutung. EGF besitzt die höchste Affinität gegenüber erbB1, aber er kann auch erbB1/ erbB2-, erbB1/ erbB3- und erbB1/ erbB4-Dimere stabilisieren [Wolf, 2001].

EGF ist offenbar an der autokrinen Regulation der Knochenbildung beteiligt. Tierexperimentelle Studien belegen die Gegenwart von EGF in der Wachstumsfuge der Röhrenknochen und zeigen, dass Knochenvorläuferzellen auf die Einwirkung von EGF ansprechen [Yoneda, 1996; Bonassar & Trippel, 1997]. Zahlreiche In-vitro-Experimente bestätigen ferner das Vorhandensein von EGF-Rezeptoren (erbB1) auf der Oberfläche der Knochenvorläuferzellen und Osteoblasten und beweisen zudem, dass EGF die Proliferation osteogener Zellen fördert, deren Differenzierung jedoch unterdrückt. So wurden in mit EGF behandelten Kulturen eine verringerte Expression von Kollagen I und niedrigere Werte der ALP-Aktivität registriert [Yoneda, 1996]. Ähnlich wie bei FGF-2 sind die erreichten Effekte offensichtlich vom Entwicklungsstadium der Zellen, von der gewählten EGF-Konzentration und von der Einwirkungsdauer des Zytokins abhängig. Im Mausmodell

steigerte eine 7-tägige EGF-Verabreichung in der Dosis von 20 ng/g die Aktivität der Osteoblasten, eine gleich lange Behandlung mit 200 ng/g förderte im Gegensatz dazu die Knochenresorption [Marie et al., 1989]. In vitro erhöhte eine kurzzeitige Anreicherung des Kulturmediums mit EGF dementsprechend die Anzahl der osteogenen Zellkolonien, eine länger als 4 Tage andauernde verringerte ihre Zahl [Yoneda, 1996]. Es ist bekannt, dass die höchste EGF-Bindungskapazität gerade jene Knochenvorläuferzellen besitzen, die sich in einem frühen Entwicklungsstadium befinden [Aubin & Liu, 1996]. EGF ist zudem - zusammen mit PDGF-BB - derjenige Wachstumsfaktor, der in humanen Knochenmarkskulturen die Anzahl der fibroblastoiden Einzelkolonien (Colony Forming Units-Fibroblast) am effizientesten steigert [Gronthos & Simmons, 1995].

Transforming Growth Factors beta, TGF- $\beta$ s, sind Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie, die neben TGF- $\beta$ s auch Aktivine, Inhibine, Müllerian-Inhibiting Substance (MIS), Growth and Differentiation Factors (GDFs) und Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) umfasst [Bonewald, 1996]. TGF- $\beta$ s sind aus zwei mit Disulfid-Brücken verbundenen Polypeptidketten aufgebaute Dimere. Zurzeit sind 5 in ihrer Aminosäuresequenz sehr ähnliche Isoformen von TGF- $\beta$  bekannt. Nur drei von ihnen, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3, sind in Säugetieren vorzufinden, wo sie von fast allen Zellen synthetisiert werden und Vermehrung, Migration und Differenzierung einer großen Vielfalt verschiedener Zelltypen beeinflussen. Die bedeutendsten Mengen von TGF- $\beta$ s sind jedoch im Knochengewebe und in den in der Blutbahn zirkulierenden Thrombozyten enthalten. So entspricht z.B. die Konzentration von TGF- $\beta$ s im Knochengewebe ca. 200  $\mu$ g/kg und ist damit etwa 100-mal höher als in allen anderen Gewebetypen. Außerdem sind die Osteoblasten diejenigen Zellen, die die höchste Anzahl an TGF- $\beta$ -Rezeptoren besitzen [Szczesny, 2002].



**Abb. 1.12**

Darstellung der beiden latenten Formen von TGF- $\beta$ , die von osteogenen Zellen gebildet werden. Der latente Komplex I stellt wahrscheinlich die zirkulierende Form dar. Die roten Pfeile bezeichnen die Stellen, die während der Freisetzung des Wachstumsfaktors von spezifischen Proteasen, z.B. von Plasmin, gespalten werden [übernommen aus Bonewald, 1996].

TGF- $\beta$ s werden von allen Zelltypen, auch von osteogenen Zellen, in latenter Form sekretiert. Diese Form stellt einen meist 100 kDa großen Komplex dar, der neben einer der TGF- $\beta$ -Isoformen auch einen Precursor, das so genannte Latency-Associated Peptide (LAP) enthält. Dabei stellen die osteogenen Zellen eine Ausnahme dar: Sie bilden noch eine zweite Form der latenten TGF- $\beta$ s (Abb.1.12). Dieser zweite, 290 kDa große Komplex beinhaltet einen der TGF- $\beta$ s, LAP und ein Protein (Latent TGF- $\beta$  Binding Protein (LTBP)), welches die latent vorhandenen TGF- $\beta$ s an die ECM bindet. In der ECM formt LTBP lange fibrilläre Strukturen, in denen es auch in freier, mit den TGF- $\beta$ s nicht assoziierter Form vorkommt. Ferner könnte LTBP auch an der Regulation der Aktivität dieser Wachstumsfaktoren beteiligt sein. Zurzeit sind drei LTBP-Isoformen (LTBP-1, -2, -3) bekannt, die als frühe Marker der osteogene Differenzierung gelten [Bonewald, 1996].

Die Freisetzung und Aktivierung von TGF- $\beta$ s ist ein zweistufiger Prozess (siehe Abb. 1.12), an dem spezifische Proteasen, wie z.B. Plasmin, beteiligt sind. Zuerst wird das LTBP an seiner proteasesensitiven Region gespalten. Dabei wird ein 130 kDa großes Fragment freigesetzt, das zur Zelloberfläche wandert und dort an die LTBP-Bindungsstellen andockt. Danach spaltet das membrangebundene Plasmin das LAP ab und setzt den jeweiligen TGF- $\beta$  frei. Die freigesetzten und aktivierten TGF- $\beta$ s können ferner mit den transmembranen Rezeptoren interagieren oder mit dem  $\alpha$ 2-Makroglobulin assoziieren und so entsorgt werden. Zwei weitere Proteine der Knochenmatrix, Decorin und Biglycan, binden freigesetzte TGF- $\beta$ s und sind an der Aufrechterhaltung und Regulation ihrer Aktivität beteiligt [Bonewald, 1996; Blumberg et al., 1997].

**Tabelle 1.4**

**Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren in der TGF- $\beta$ -Superfamilie**

[adaptiert aus Sakou, 1998; Miyazono, 2000b]

Typ-I-Rezeptoren	Typ-II-Rezeptoren
ALK-1	T $\beta$ R-II
ActR-I (ALK-2)	BMPR-II
BMPR-IA (ALK-3)	ActR-II
ActR-IB (ALK-4)	ActR-IIIB
T $\beta$ R-I (ALK-5)	AMHR-II
BMPR-IB (ALK-6)	
ALK-7	

Der Ablauf der Signalvermittlung nach der Ligandenbindung ist für alle Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie, einschließlich TGF- $\beta$ s, prinzipiell ähnlich und kann am Beispiel von BMPs stellvertretend dargestellt werden (siehe Abb. 1.14) [Sakou, 1998]. Die Liganden dieser Zytokingruppe lösen in der Zelle ein Signal aus, indem sie an zwei verwandten Typen (Typ-I und Typ-II) von transmembranen Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren, die auch als Activin-receptor-like-Kinasen (ALKs) bezeichnet werden, anbinden und sie zu einem heterooligomeren Rezeptor-Ligand-Komplex zusammenführen. Der großer Anzahl

von ca. 40 zur Zeit bekannten Liganden stehen vergleichsweise wenige Rezeptoren zur Verfügung; bis jetzt sind nur sieben Typ-I und fünf Typ-II Rezeptoren bekannt (Tabelle 1.4) [Ebendal et al., 1998; Itoh et al., 2000]. Dabei wird in diesem Rezeptorensystem die Spezifität des Signals hauptsächlich von den Typ-I-Rezeptoren bestimmt.

Im Falle von TGF- $\beta$ s, deren Rezeptoren auf der Zelloberfläche teilweise schon in Form von Homodimeren vorliegen, bindet der Ligand zuerst an die Typ-II-Rezeptoren, die in ihrer intrazellulären Domäne eine permanent aktive Kinase besitzen [Gilboa et al., 1998; Gilboa et al., 2000]. Danach werden an diesem Ligand/Typ-II-Rezeptor-Komplex die Typ-I-Rezeptoren angebunden. Anschließend transphosphorylieren die Kinasen der Typ-II-Rezeptoren die GS-Domänen in der Kinase-Region der Typ-I-Rezeptoren. Dadurch werden die Kinasen der Typ-I-Rezeptoren aktiviert, die wiederum die nächsten Downstream-Effektoren der Signalkaskade, die so genannten R-Smads, phosphorylieren. In Vertebraten sind zur Zeit insgesamt acht Smad-Proteine identifiziert, die auf Grund ihrer Struktur und Funktion in drei Gruppen eingeteilt werden können: (1) Rezeptor-aktivierte-Smads (receptor-activated Smads, R-Smads 1, 2, 3, 5, 8), (2) gemeinsames Smad (common Smad 4, co-Smad 4) und (3) inhibierende Smads (inhibitory Smads, anti-Smads 6, 7) [Sodek & Cheifetz, 2000]. Die Aktivierung der R-Smads ist ligandenspezifisch. Bei der von den TGF- $\beta$ s induzierten Signalübertragung sind z.B. ausschließlich die strukturell sehr ähnlichen Smad 2 und Smad 3 beteiligt, bei der von BMPs induzierten hingegen Smad 1, Smad 5 und Smad 8. Nach der Phosphorylierung bilden die R-Smads einen heteromeren Komplex mit dem co-Smad 4 aus, der in viele verschiedene Smad-Kaskaden involviert ist. Dieser R-Smad/co-Smad 4-Komplex transloziert in den Zellkern, wo er entweder direkt an spezifische Sequenzen in der Promotorregion des Zielgens bindet oder mit den DNA-bindenden-Proteinen und transkriptionalen Kofaktoren interagiert [Sakou, 1998; Miyazono, 2000b; Sodek & Cheifetz, 2000]. Anti-Smads verhindern die Phosphorylierung der R-Smads und unterbinden dadurch die Signalübertragung; dabei inhibiert Smad 7 vorwiegend die von TGF- $\beta$ s induzierten Signale, Smad 6 die von BMPs induzierten [Itoh et al., 2000; Miyazono, 2000a; Ripamonti & Tasker, 2000; Zimmermann & Padgett, 2000]. Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre weisen jedoch darauf hin, dass die Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie außer dem von Smads vermittelten auch anderen Signaltransduktionswege aktivieren können [Sakou, 1998; Itoh et al., 2000; Nohe et al., 2002; Canalis et al., 2003].

Neben den TGF- $\beta$ -Rezeptor-Typ-I (T $\beta$ R-I) und -Typ-II (T $\beta$ R-II) binden die TGF- $\beta$ s auch an den Rezeptor-III, ein Betaglycan, das in die Signalübertragung nicht direkt involviert ist. Es stellt wahrscheinlich einen Mittler dar, der den Liganden nur transient bindet und mit dem T $\beta$ R-II im Kontakt bringt [Bonewald, 1996; Szczesny, 2002].

Chondrozyten, osteogene Zellen und Osteoklasten synthetisieren alle drei TGF- $\beta$ -Isoformen und besitzen alle drei TGF- $\beta$ -Rezeptoren. Der Großteil der im Skelettsystem vorhandenen TGF- $\beta$ s wird jedoch von reifen Osteoblasten produziert [Horner et al., 1998;



**Kassem et al., 2000; Szczesny, 2002].** Die Angaben über Funktion und Expressionsmuster einzelner TGF- $\beta$ -Isoformen im Knochengewebe sind nicht eindeutig und häufig widersprüchlich. Offenbar bestehen in Wirkungsweise, Wirkungs- und Expressionsgrad jedoch Unterschiede, die bis jetzt nicht ausreichend präzise erforscht sind. Deshalb wird oft verallgemeinernd von TGF- $\beta$  und nicht von TGF- $\beta$ 1, -2 oder -3 berichtet. Es ist jedoch nachgewiesen, dass sich die TGF- $\beta$ -Isoformen gegenseitig beeinflussen und ihre biologische Aktivität und Synthese teilweise selbst regulieren können **[Bonewald, 1996; Fagenholz et al., 2001].**

**Tabelle 1.5**

**Durch TGF- $\beta$ -Isoformen regulierte Proteine und Zytokine**

[adaptiert aus Bonewald, 1996; Liu et al., 1999; Kassem et al., 2000; Fagenholz et al., 2001; Szczesny, 2002]

ECM- und Membranproteine	Zytokine	ECM abbauende und den Abbau regulierende Proteine
Kollagen I ? Fibronectin ↑ OP ↑ ON ↑ Thrombospondin ↑ Decorin ↑ ALP ? OC ↓ Integrine ↑ LTBP ↑	TGF- $\beta$ -Isoformen ↑↓ EGF ↓	Metalloproteasen ↓ Gewebehinhibitoren der Metalloproteasen ↑

↑ = die Expression wird gefördert; ↓ = die Expression wird gehemmt; ↑↓ = die Expression wird reguliert;  
 ? = widersprüchliche Angaben.

TGF- $\beta$ s sind multifunktionelle Wachstumsfaktoren, die im Skelettsystem die Differenzierung und funktionelle Aktivität sowohl der Chondrozyten als auch der Osteoblasten und Osteoklasten stark beeinflussen **[Horner et al., 1998].** Damit sind TGF- $\beta$ s wichtige Regulatoren der Knochenhomöostase, die im gesunden Organismus die Prozesse des Knochenabbaus und -aufbaus ausgleichend verkoppeln **[Bonewald, 1996; Erlebacher et al., 1998; Sodek & Cheifetz, 2000].** So fungieren z.B. während des proteolytischen Abbaus der Knochenmatrix die von Osteoklasten wieder freigesetzten und aktivierten TGF- $\beta$ s als starke Chemoattraktanten, die eine gezielte Migration der osteogenen Zellen zu den Regionen des Knochenumbaus induzieren und ihre Differenzierung begünstigen. **[Bonewald, 1996; Mundy et al., 2001].** Gleichzeitig wirken die aktivierten TGF- $\beta$ s auch als Feed-back-Signal, das die Entstehung neuer Osteoklasten inhibiert und die Apoptose reifer Osteoklasten hervorruft **[Hughes et al., 1994; Liu et al., 1999; Mundy et al., 2001; Szczesny, 2002].** Wie auch bei allen anderen Wachstumsfaktoren sind die erreichbaren Effekte stark vom Entwicklungsstadium der Zellen, den Kultivierungsbedingungen sowie von Wirkungsdauer und Dosis der verabreichten TGF- $\beta$ s abhängig. So führte im Mausmodell eine subkutane Injektion über drei Tage von je 1  $\mu$ g aktiven TGF- $\beta$ s in den Schädelbereich zu einer 40%igen Zunahme der Dicke der Schädelknochen **[Mundy et al., 2001].** Transgene Mäuse



mit einer kontinuierlichen, Osteoblasten-spezifischen TGF- $\beta$ 2-Überexpression zeigten dagegen einen erhöhten, aber disbalancierten Knochenumbau, der mit einem merklichen Schwund der Knochenmasse und erkennbar niedrigerer Knochenmineralisierung verbunden war [Erlebacher & Derynck, 1996]. Ähnliche Effekte wurden auch in Experimenten mit Zellkulturen erreicht. Eine transiente Behandlung mit aktivem TGF- $\beta$  förderte die Proliferation osteogener Zellen, eine länger andauernde verzögerte die terminale Differenzierung und minderte die Mineralisierung der ECM [Liu et al., 1999]. In den meisten der In-vitro-Experimente begünstigten jedoch die TGF- $\beta$ s die Ausbildung der ECM und reduzierten die Aktivität der matrixabbauenden Metalloproteasen (siehe Tab. 1.5).

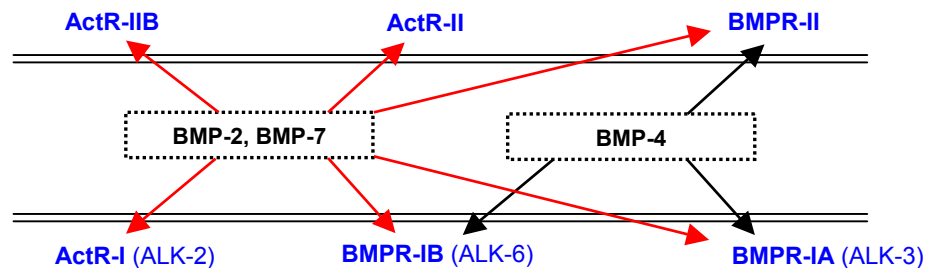
Bone Morphogenetic Proteins, BMPs, die nächsten wichtigen Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie wurden 1965 von dem Unfallchirurgen und Orthopäden Dr. Marshall Urist entdeckt. Er beschrieb die Methode der Herstellung eines osteoinduktiven Extrakts aus einem adulten, demineralisierten Knochen und zeigte, dass dieser Extrakt offensichtlich einen Faktor enthält, der nach einer subkutanen oder intramuskulären Injektion eine ektope enchondrale Knochenbildung hervorruft. Urist gab dem osteoinduktiven, damals noch nicht näher charakterisierten Faktor den Namen „Bone morphogenetic protein“. Lange Zeit gelang es nicht BMP als ein separates Protein zu isolieren. Erst in den 80er und Anfang der 90er des letzten Jahrhunderts wurden gleich mehrere BMP-Isoformen identifiziert und die cDNA für diese Proteine kloniert [Sampath & Reddi, 1981; Wozney et al., 1988; Celeste et al., 1990]. Heutzutage gehören zur BMP-Subfamilie, die neben BMPs auch GDFs beinhaltet, insgesamt 22 Proteine. Der Homologie ihrer Aminosäuresequenz nach werden die meisten Mitglieder dieser Subfamilie in 6 Gruppen unterteilt: (1) BMP-2 (BMP-2a), BMP-4 (BMP-2b); (2) BMP-3 (Osteogenin), BMP-3b (GDF-10); (3) BMP-5, BMP-6 (VGR-1), BMP-7 (OP-1), BMP-8 (OP-2); (4) BMP-9 (GDF-2), BMP-10; (5) BMP-12 (GDF-7, CDMP-3), BMP-13 (GDF-6, CDMP-2), BMP-14 (GDF-5, CDMP-1); (6) BMP-11 (GDF-11), GDF-8 (Myostatin). Dabei besitzt jede BMP-Isoform ein eigenes Expressionsprofil, eine eigene Affinität gegenüber den BMP-Rezeptoren und folglich eine charakteristische biologische Aktivität [Miyazono, 2000a]. Im Gegensatz zu TGF- $\beta$ s werden BMPs in einer biologisch aktiven Form sekretiert. Biologisch aktive BMPs stellen Homo- oder Heterodimere dar, die aus zwei mit einer Disulfid-Brücke verbundenen Polypeptidketten zusammengesetzt sind. Dabei sind die BMP-Heterodimere meist biologisch deutlich aktiver als Homodimere [Israel et al., 1996; Rosen et al., 1996]. Diese multifunktionellen Zytokine sind nicht nur im Skelettsystem, sondern auch in anderen Organen, im Nervensystem, im Magen-Darm-Trakt, in den Nieren, im Herz und in der Lunge verbreitet anzutreffen [Kirker-Head, 2000]. Daher regulieren BMPs Wachstum, Migration, Differenzierung und Apoptose eines breiten Spektrums verschiedenen Zelltypen, nicht nur der Knorpel- und Knochenvorläuferzellen. Zytokine der BMP-Subfamilie spielen eine äußerst bedeutende Rolle während der embryonalen Entwicklung und beeinflussen die Organogenese sowohl der Vertebraten als

auch der Invertebraten [Kirker-Head, 2000; Wozney, 2002]. Die BMPs der BMP-2/-4 Gruppe z.B. sind an der Ausbildung von Mesoderm und der Embryonalhüllen beteiligt. Dementsprechend sterben die BMP-2-, BMP-4-knock-out-Mäuse schon im embryonalen Entwicklungsstadium. Tiere mit fehlender Expression von BMPs der BMP-7-Gruppe werden geboren, weisen jedoch erhebliche Defekte in verschiedenen Organen (Nieren, Augen, Ohren) und einige abnormale Veränderungen im Skelettsystem auf [Kawabata et al., 1998; Yamaguchi et al., 2000]. Das heißt, BMPs induzieren den Differenzierungsprozess multipotenter MSC und unterstützen die Entstehung verschiedene Zelltypen, einschließlich knochenbildender Zellen. Die Angaben über die Anzahl der osteogenen BMPs, die auch im adulten Organismus eine orthotope und heterotope Knochenneubildung via chondrale oder desmale Ossifikation hervorrufen können, sind nicht eindeutig. Zurzeit werden insgesamt sieben BMPs, die ein osteogenes Potential aufweisen, erwähnt: BMP-2, -4, -5, -6, -7, -8 und -9 [Wozney & Rosen, 1998; Sodek & Cheifetz, 2000; Cheng et al., 2003; Peng et al., 2003; Kang et al., 2004]. Die aktuellen Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass BMP-6 und BMP-9 die denkbar wirkungsvollsten in dieser Gruppe sind [Kang et al., 2004].

Im Laufe der embryonalen Entwicklung des Skelettsystems werden die einzelnen BMP-Isoformen räumlich und zeitlich unterschiedlich stark exprimiert. So werden z.B. BMP-2, BMP-4 und BMP-7 schon in den frühen Phasen der Entwicklung des Skelettsystems sekretiert, während die Expression von BMP-6 deutlich später erfolgt [Ishidou et al., 1995]. Im Laufe der Knochenregeneration im adulten Organismus wird die BMP-2- und -4-Expression sowohl in chondrogenen als auch in den aus perivaskulärem Gewebe einwandernden osteogenen Zellen hochreguliert. Auch im neu gebildeten Knochengewebe exprimieren die osteogenen Zellen diese beiden BMP-Isoformen [Sakou, 1998]. In In-vitro-Kulturen osteogener Zellen werden die BMP-2-, -4- und -6-Synthese sowie die BMPR-IA-, BMPR-IB- und BMPR-II-Expression am häufigsten nachgewiesen [Yamaguchi et al., 2000; Canalis et al., 2003]. Das Expressionsmaximum der Gene für BMP-2, -4 und -6 wird dabei während der Phase der Matrix-Reifung erreicht [Aubin & Liu, 1996]. Dementsprechend wirken diese BMPs als autokrine und parakrine Regulatoren der osteogenen Differenzierung und Funktion.

Ein Teil der sekretierten BMPs wird in ECM eingelagert, wo sie an Kollagene und Proteoglycane, die Heparansulfat enthalten, binden. In immobilisierter Form sind die BMPs vor der proteolytischen Degradation geschützt. Zugleich wird eine langsame und anhaltende Abgabe dieser äußerst wirksamen Differenzierungsfaktoren gewährleistet [Reddi, 1992; Sakou, 1998; Szczesny, 2001]. Die BMP-Antagonisten (z.B. Noggin, Chordin), deren Expression in osteogenen und chondrogenen Zellen von BMPs selbst angeregt wird und die eine unterschiedliche Affinität gegenüber einzelnen BMP-Isoformen besitzen, können selektiv einen weiteren Teil der abgesonderten BMPs binden, bevor sie in eine BMP-Rezeptor-Wechselwirkung eintreten. Damit bilden diese Polypeptide einen anderen

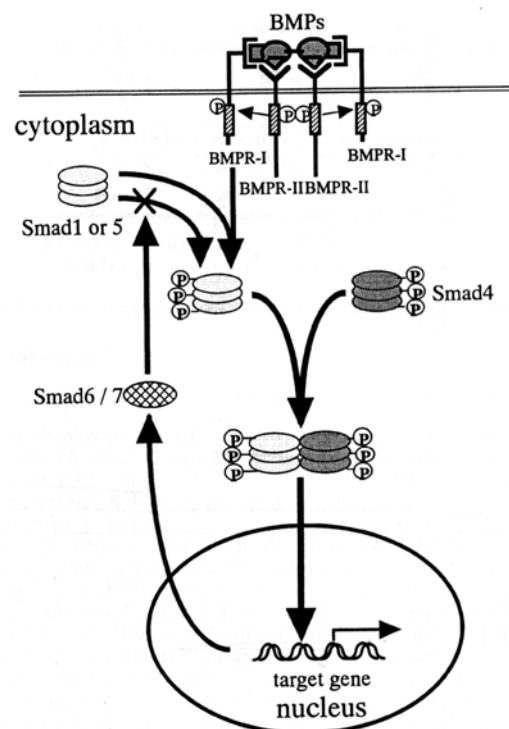
wichtigen Mechanismus, der die Aktivität der BMPs im extrazellulären Raum moduliert und die Zellen vor einer überschüssigen Exposition gegenüber diesen Differenzierungsfaktoren schützt [Miyazono, 2000a; Reddi, 2001; Canalis et al., 2003]. Auch BMP-3, das in seiner Aminosäuresequenz nur 50 % Homologie mit osteogenen BMPs aufweist, ist an der Regulierung der Aktivität osteogener BMPs beteiligt. Es wirkt als deren Antagonist und inhibiert die Osteogenese sowohl in vitro als auch in vivo [Bahamonde & Lyons, 2001; Daluiski et al., 2001]. Ferner kann jedes einzelne BMP seinen Expressionsgrad und seine Aktivität autoregulieren; es kann darin aber auch von anderen BMPs beeinflusst werden [Pereira et al., 2000].



**Abb. 1.13**

Bindungsaffinität von BMP-2, BMP-4 und BMP-7 gegenüber einigen Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren [übernommen aus Sakou, 1998].

Die osteogenen BMPs besitzen unterschiedliche Affinität gegenüber den Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren der TGF- $\beta$ -Superfamilie (Abb. 1.13). Dabei ist der Expressionsgrad der BMPs-bindenden Rezeptoren in verschiedenen Zelltypen sehr variabel [Canalis et al., 2003].



**Abb. 1.14**

Schematische Darstellung des heterooligomeren Rezeptor-Ligand-Komplexes und der Signalübertragung nach dem Andocken eines BMP-Dimers [übernommen aus Sakou, 1998].

Wahrscheinlich kann jeder heterooligomere Komplex, der nach dem Andocken eines der BMP-Dimere entsteht (Abb. 1.14), unterschiedliche intrazelluläre Reaktionen auslösen. Der genaue Mechanismus dieser Reaktionen muss noch weiter untersucht und präzisiert werden [Sakou, 1998]. Außerdem weisen die BMP-Rezeptoren im Vergleich zu TGF- $\beta$ -Rezeptoren, die während der Abwesenheit des Liganden vorwiegend in Form von Homodimeren vorliegen, ein viel flexibleres Oligomerisierungsmuster auf. So ist in der Zellmembran die Existenz sowohl von schon vorgeformten Heterodimeren BMPR-II/BMP-IA, BMPR-II/BMPR-IB, BMPR-IA/BMPR-IB als auch von Homodimeren BMPR-II/BMPR-II, BMPR-IA/BMPR-IA, BMPR-IB/BMPR-IB nachgewiesen. Sie ermöglichen wahrscheinlich eine viel höhere Vielseitigkeit und Spezifität der intrazellulären Reaktionen nach dem Andocken der BMPs [Gilboa et al., 2000]. Die Entstehung von Rezeptor-Heterodimeren schon vor der Ligandenbindung löst offensichtlich keine ligandunabhängige Signalübertragung aus. Dafür ist eine Konformationsveränderung innerhalb des Rezeptor-Komplexes, die nur durch BMP-Bindung verursacht wird, nötig [Gilboa et al., 2000].

**Tabelle 1.6****Durch BMP-2 regulierte Proteine und Zytokine**

[adaptiert aus Lecanda et al., 1997 ; Fromigüé et al., 1998 ; Haÿ et al., 1993, 2000; Canalis et al., 2003 ; Diefenderfer et al., 2003]

Transkriptionsfaktoren	ECM- und Membranproteine	Zytokine	ECM abbauende und den Abbau regulierende Proteine
Cbfa/Osf2 ↑	Kollagen I ? OP ↑ BSP ↑ Decorin ↑ ALP ↑ OC ↑ Noggin ↑ Cadherine ↑	IGF ↑ BMP-Isoformen ↑↓	Kollagenase 3 ↓

↑ = die Expression wird gefördert; ↓ = Die Expression wird gehemmt; ↑↓ = die Expression wird reguliert, ? = widersprüchliche Angaben.

BMP-2, das als Prototyp aller osteogenen BMPs eingesehen wird, ist zweifellos am genauesten untersucht. Gleich wie die anderen osteogenen BMPs initiiert es die Differenzierung der MSC in die osteogene und chondrogene Richtung und unterdrückt gleichzeitig die Myogenese [Sodek & Cheifetz, 2000; Yamaguchi et al., 2000; Peng et al., 2003]. Im Gegensatz zu höheren BMP-2-Konzentrationen, die in Kulturen multipotenter MSC die Entstehung von Knorpel- und Knochenvorläuferzellen hervorrufen, stimulieren niedrige Konzentrationen jedoch die Adipogenese [Wang et al., 1993]. In adipogenen, myogenen Zellen und Fibroblasten kann BMP-2 zwar die Expression des Transkriptionsfaktors Cbfa1/Osf2 und der ALP veranlassen, jedoch als alleiniger Faktor keine terminale osteogene Differenzierung hervorrufen [Kawasaki et al., 1998; Skillington et al., 2002]. BMP-2 wirkt als Chemoattraktant, der eine gezielte chemotaktische Migration der osteogenen

Zellen fördert. Gleichzeitig induziert es die Apoptose reifer Osteoblasten und stimuliert die Knochenresorption durch direkte Unterstützung der Osteoklastengenese und Erhöhung der funktionalen Aktivität der Osteoklasten [Sakou, 1998; Haÿ et al., 2001; Canalis et al., 2003]. Damit fördert BMP-2 den Knochenumbau, der für eine normale Entwicklung des Skelettsystems äußerst bedeutend ist. Die Angaben über den Einfluss von BMP-2 auf die Proliferation osteogener Zellen sind dagegen sehr widersprüchlich [Kawasaki et al., 1998; Haÿ et al., 1999; Wilke et al., 2001]. Die wichtigsten Proteine und Zytokine, deren Expression bei In-vitro-Kulturen durch die Zugabe von BMP-2 beeinflusst wird, sind in der Tabelle 1.6 zusammengefasst.

In den letzten Jahren wurden die osteoinduktiven Eigenschaften der rekombinanten BMP-2 und BMP-7 erfolgreich sowohl in vielen Tiermodellen als auch in ersten klinischen Pilotstudien getestet (siehe 1.3.1) [Wozney & Rosen, 1998; Riedel & Valentin-Opran, 1999; Tamura et al., 2001; Valentin-Opran et al., 2002; Wozney, 2002].

[Interleukin-1 \(IL-1\) und Interleukin-6 \(IL-6\)](#) sind multifunktionale Zytokine, die eine ähnliche biologische Aktivität besitzen und an der Regulation immunologischer Reaktionen und Entzündungsprozessen beteiligt sind. Beide gehören zur Gruppe der pro-inflammatorischen Zytokine und werden im Körper von vielen Zelltypen produziert, u.a. auch von osteogenen Zellen. Im Knochengewebe spielen IL-1 und IL-6 eine bedeutende Rolle als Regulatoren des Knochenumbaus.

Es sind zwei genetisch und biochemisch unterschiedliche IL-1-Isoformen bekannt, IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , die eine nur 30 % Homologie in ihren Sequenzen aufweisen aber sehr ähnliche Effekte hervorrufen [Tatakis, 1993; Sobue et al., 2001]. Die IL-1-Isoformen binden an zwei IL-1-Rezeptoren, Typ-I-Rezeptor und Typ-II-Rezeptor, welche zu den Proteinen der IgG-Superfamilie gehören. Offensichtlich ist nur der membranständige Typ-I-Rezeptor an der Signalübertragung in das Zellinnere beteiligt. Der Typ-II-Rezeptor, der in Form eines löslichen Proteins auch in die Blutbahn abgeleitet und oft als „decoy receptor“ bezeichnet wird, bindet beide IL-1-Isoformen und verhindert damit ihre Interaktion mit dem Typ-I-Rezeptor. Im Jahre 1985 wurde noch ein weiteres effektives und hochspezifisches Protein entdeckt, das die biologische Aktivität von IL-1 im extrazellulären Raum reguliert. Der so genannte IL-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1 receptor antagonist (IL-1ra)) kann an beide IL-1-Rezeptortypen andocken, jedoch keine Signaltransduktion auslösen [Tatakis, 1993; Horowitz & Lorenzo, 1996; Sacht, 1998]. Bei Zellen, die auf IL-1 ansprechen, treten die IL-1-Rezeptoren fast immer nur in einer sehr geringen Zahl auf [Sacht, 1998]. Die Signalübertragungswege, die nach der Entstehung des IL-1/Typ-I-Rezeptor-Komplexes in der Zelle aktiviert werden, sind bislang nur teilweise geklärt. Allerdings besitzt der Typ-I-Rezeptor keine intrinsische Kinaseaktivität und kann damit die Signalübertragung nicht direkt induzieren. Der Transfer des Signals erfolgt offensichtlich durch das IL-1-Rezeptor-assoziierte-Protein (IL-1RAcP) und den nuklearen Faktor-kB (NF-kB). Ein anderer Weg der Signaltransduktion läuft

wahrscheinlich über das interagierende Protein IIP1 (IL-1 receptor interacting protein) und G-Proteine (GTPase activating proteins) [Sacht, 1998].

Gowen et al. haben 1983 zum ersten Mal den starken stimulierenden Effekt beschrieben, den IL-1 auf die Knochenresorption ausübt. Im Knochengewebe wird dieses Zytokin von Osteoblasten, Osteoklasten und Makrophagen produziert, wo es schon in einer picomolaren Konzentration als ein effektiver autokriner und parakriner Faktor wirkt [Tatakis, 1993; Sobue et al., 2001; Warghese & Canalis, 2003]. In vivo fördert IL-1 die Entstehung von Osteoklasten und reguliert den Knochenumbau. Dabei handelt IL-1 überwiegend als starker Inhibitor der Knochenbildung; es kann auf diesen Prozess jedoch auch einen positiven Effekt ausüben [Horowitz & Lorenzo, 1996]. In vitro begünstigt IL-1 z.B. die Fortentwicklung früher Knochenvorläuferzellen und hemmt die Funktion von osteogenen Zellen, die sich in einem reiferen Entwicklungsstadium befinden [Tatakis, 1993]. Oft werden die von IL-1 induzierten Effekte indirekt, d.h. über ein weiteres Zytokin, vermittelt. IL-1 fördert z.B. die Expression von IL-6 und FGF-2, stimuliert die Aktivität von TGF- $\beta$ -Isoformen und erhöht die mitogene und chemotaktische Wirkung von PDGF [Tatakis, 1993; Sobue et al., 2001]. Es wird dennoch auch mit der Entstehung von Osteoporose, Parodontalerkrankungen und mit der rheumatoiden Arthritis in Verbindung gebracht.

Das von osteogenen Zellen im Knochengewebe synthetisierte IL-6 fördert ebenfalls die Genese und die Aktivität der Osteoklasten [Erschler & Keller, 2000; Kumar et al., 2001]. Es unterstützt außerdem die Differenzierung von Osteoprogenitorzellen, erhöht die Expression der ALP und des OC. IL-6 ist in der Lage auch seine eigene Produktion zu autoregulieren und den Expressionsgrad der beiden IL-6-Rezeptoreinheiten zu reduzieren [Manolagas, 1998]. Störungen in der Regulation der IL-6-Synthese sind ein wichtiger Osteoporose auslösender Faktor [Manolagas, 1998; Erschler & Keller, 2000].

Die  $\alpha$ -Untereinheiten des IL-6-Rezeptors (Glycoprotein gp-80), welche auf der Zelloberfläche von osteogenen Zellen und offensichtlich auch von Osteoklasten-Vorläuferzellen vorzufinden sind, besitzen in ihren intrazellulären Domäne keine Kinase-Region und können deswegen, ähnlich wie die IL-1-Typ-I-Rezeptoren, eine direkte Signalinduktion nicht hervorrufen [Manolagas et al., 1996; Manolagas, 1998; Erschler & Keller, 2000]. Nach dem Andocken der IL-6-Moleküle schließt sich der Ligand/gp-80-Komplex mit dem transmembranen Glycoprotein gp-130 ( $\beta$ -Untereinheit) zusammen, welcher zu einer eigenständigen Ligandenbindung sonst nicht fähig ist. Danach wird an diesen Komplex ein weiteres gp-130-Protein angebunden. Dieser Dimerisierungsprozess aktiviert die JAK-Kinasen, führt zu Tyrosinphosphorylierung und zu einer von STAT vermittelten Signaltransduktion. Neben dem JAK/STAT-Weg kann die Signalübertragung auch über den MAPK-Weg erfolgen [Bellido et al., 1997]. Es ist interessant, dass die  $\alpha$ -Untereinheiten des IL-6-Rezeptors auch in einer löslichen Form vorliegen. Im Gegensatz zum IL-1-Typ-II-Rezeptor sind die löslichen  $\alpha$ -Untereinheiten (die löslichen IL-6-Rezeptoren (sIL-6R)) auch an der Signalübertragung beteiligt. Nach der Ligandenbindung

können die entstandenen Komplexe auf der Zelloberfläche mit den  $\beta$ -Untereinheiten verschmelzen. Auf diese Weise sind auch die Zellen, welche auf ihrer Oberfläche keine entsprechenden  $\alpha$ -Untereinheiten besitzen, imstande auf IL-6 zu reagieren (Horowitz & Lorenzo, 1996; Lin et al., 1997; Erschler & Keller, 2000).

### 1.3 Tissue Engineering des Knochengewebes

Knochen-Tissue-Engineering ist ein relativ junges Gebiet der regenerativen Medizin, das auf den Kenntnissen des natürlichen Prozesses der Knochenregeneration und der Biologie des Knochengewebes basiert. Für das Knochen-Tissue-Engineering werden drei substantielle Elemente benötigt: (1) eine Quelle der zur Osteogenese befähigten Zellen, (2) Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, die eine gezielte Entwicklung dieser Zellen fördern und (3) ein biokompatibles und bioabbaubares dreidimensionales Trägermaterial, das die ECM des Knochengewebes imitiert und das die Matrix für die Adhäsion, Migration und Proliferation der an Osteogenese beteiligten Zellen bildet [Bruder & Fox, 1999]. Einzelne oder alle drei Elemente können in die Zone eines Knochendefekts eingebracht werden, um den natürlichen Regenerationsprozess des Knochengewebes zu unterstützen. Die Wahl eines signifikanten Zelltyps, des Trägermaterials oder die Kombination der verwendeten Wachstumsfaktoren sind von den konkreten klinischen Indikationen abhängig.

#### 1.3.1 Strategien des Knochen-Tissue-Engineerings

In den vergangenen Jahren wurden im Bereich des Knochen-Tissue-Engineerings drei grundlegende Strategien etabliert, die als: (1) matrixorientiert, (2) faktororientiert oder (3) zellorientiert bezeichnet werden können [Bruder & Fox, 1999].

Bei [matrixorientierten Verfahren](#) wird die verlorene Knochensubstanz unmittelbar durch ein synthetisches Biomaterial z.B. eine aus  $\beta$ -Tricalciumphosphat oder Hydroxylapatit hergestellte Biokeramik oder Polymere ersetzt. Diese Materialien haben eine poröse Struktur und dienen als Trägergerüste, die das Einwandern der endogen vorhandenen Knochenvorläuferzellen aus dem direkt angrenzenden intakten Gewebe und die Angiogenese ermöglichen. Die einwandernden Zellen produzieren neues Knochengewebe, welches in das implantierte Biomaterial allmählich einwächst. In diesem osteokonduktiven Prozess wird das Trägergerüst entweder abgebaut oder in das neu gebildete Knochengewebe inkorporiert. Die fehlenden osteoinduktiven und oft ungünstigen physikalischen und biologischen Eigenschaften (z.B. Brüchigkeit und sehr langsamer Abbau der Biokeramik im Körper) limitieren jedoch stark die Möglichkeiten eines separaten Einsatzes dieser Materialien [Hollinger et al., 1996; Johnson et al., 1996; Rose & Oreffo, 2002].

Bei [faktororientierten Verfahren](#) werden in die Zone des Knochendefekts osteoinduktive Faktoren (z.B. rekombinantes BMP-2) eingebracht. Sie werden entweder unmittelbar injiziert, manchmal auch zusammen mit einer Trägersubstanz, oder in ein

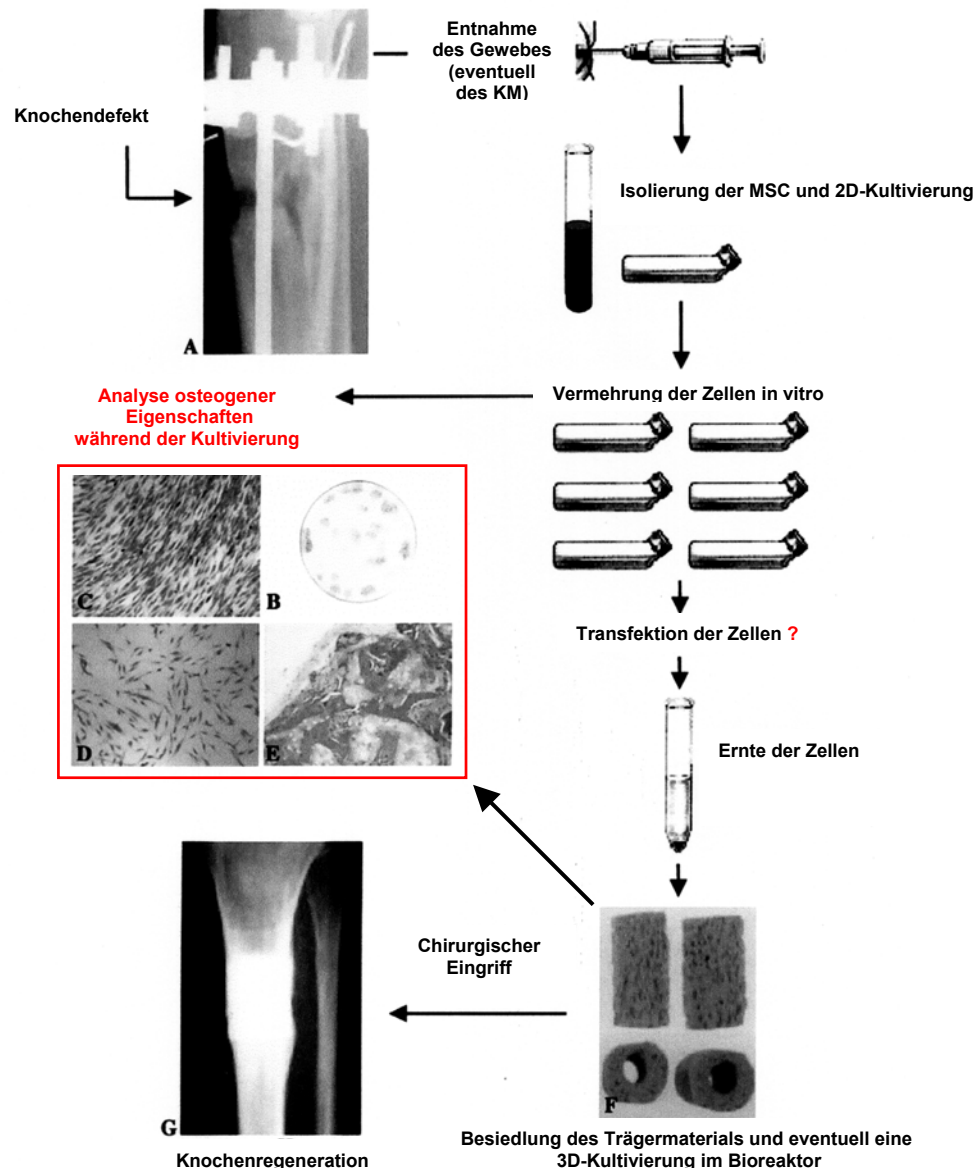
dreidimensionales Trägermaterial inkorporiert und mit ihm zusammen implantiert [Jadlowiec et al., 2003; Shin et al., 2003; Kofron et al., 2004]. Eine direkte Einspritzung ist oft ineffektiv, weil die osteoinduktive Substanz in den meisten Fällen sehr schnell ihre biologische Aktivität verliert oder aus dem Applikationsbereich entfernt wird. Die Adsorption des osteoinduktiven Faktors an die Oberfläche eines Trägermaterials, vorwiegend eines synthetischen Polymers, oder seine Verkapselung in eine Polymer- oder Hydrogelmatrix gewährleisten eine sukzessive, länger anhaltende Abgabe des Faktors und dadurch eine viel effizientere Förderung der Knochenregeneration [Rose & Oreffo, 2002; Kofron et al., 2004]. Das Hauptproblem bei der Anwendung dieser Verfahren liegt vor allem in der exakten Bestimmung der individuellen therapeutischen Dosis des Faktors. Ferner verlangen sie die Herstellung eines solchen Trägermaterials oder Bindemittels, in dem die osteoinduktive Substanz wirksam und ohne den Verlust seiner biologischen Aktivität überreicht werden kann [Wright, 2000]. Eine neue Forschungsrichtung ist die Entwicklung so genannter biomimetischer Materialien, die spezifische Zell-Matrix-Interaktionen imitieren und damit die Einwanderung osteogener Zellen nach der Implantation des Materials beschleunigen. Bei diesen Verfahren wird die Oberfläche des Biomaterials entweder mit nativen, die Zelladhäsion fördernden Proteinen (z.B. Fibronectin, Laminin) beschichtet oder chemisch durch Inkorporation von spezifischen Signalpeptiden modifiziert (z.B. RGD-Aminosäuresequenz) [Shin et al., 2003].

Bei [zellbasierten Verfahren](#) wird in den Bereich des Knochendefekts ein Verband von zur Osteogenese befähigten Zellen eingebracht. Diese Verfahren sind besonders in den Fällen geeignet, wo der endogene Pool der osteogenen Zellen infolge von Alter, Osteoporose oder durch Erkrankungen des Stoffwechsels stark begrenzt oder funktionell nicht ausreichend aktiv ist. Es sind insgesamt vier unterschiedliche Methoden beschrieben, die sich auf die Implantation von nicht fraktionierten, frisch isolierten Knochenmarkszellen, fraktionierten, in vitro expandierten Knochenmarkszellen d.h. MSC, vordifferenzierten osteogenen Zellen und genetisch veränderten Zellen stützen [Bruder & Fox, 1999].

Die autologe Transplantation von frischem nicht fraktioniertem Knochenmark war eine der ersten in der Klinik angewandten Methoden des Knochen-Tissue-Engineerings. Dabei werden die Knochenmarkszellen aus dem Beckenkamm des Patienten entnommen und unverzüglich in den Bereich des Knochendefekts entweder direkt oder in Kombination mit einem geeigneten Biomaterial reimplantiert. Wenn auch diese Methode zu einer guten Heilung des Knochendefekts führen kann [Conolly et al., 1991; Conolly, 1995], ist ihr praktischer Einsatz wegen der sehr niedrigen Zahl osteogener Zellen im frischen Knochenmark (weniger als 0,001 %) und deren Abhängigkeit von Alter und Gesundheitszustand des Patienten doch begrenzt [Bruder & Fox, 1999]. Deshalb wurde gleichzeitig eine ganze Reihe von Techniken entwickelt, die die Isolation der MSC aus einem kleinen Knochenmarksaspirat erlauben und danach eine intensive In-vitro-



Vermehrung der gewonnenen MSC ohne wesentlichen Verlust ihren phänotypischen Eigenschaften ermöglichen [Haynesworth et al., 1991; Bruder et al., 1997b; Pitteger et al., 1999; Hung et al., 2002]. Präklinische tierexperimentelle Studien und die ersten klinischen Daten zeigen, dass aus dem Knochenmark isolierte, in vitro expandierte und in einem porösen biokeramischen Trägermaterial integrierte MSC nach der Reimplantation ein vitales, vaskularisiertes und biomechanisch stabiles Knochengewebe bilden können [Bruder et al., 1998; Kon et al., 2000; Quarto et al., 2001]. Dabei erfolgt die Differenzierung der MSC innerhalb des Körpers.



**Abb. 1.15**

Prinzipielles Schema des Knochen-Tissue-Engineerings. A - Röntgenaufnahme eines umfangreichen Knochendefekts im Bereich der Tibia; B,C,D,E – Bestimmung der Expression von knochenspezifischen Markern während der In-vitro-Kultivierung; F – Beispiel eines Trägermaterials (großporiger Hydroxylapatit); G - Röntgenaufnahme des gleichen Bereichs von rechter Tibia 18 Monate nach der Transplantation des mit osteogenen Zellen besiedelten Biomaterials, KM - Knochenmark [adaptiert aus Cancedda et al., 2003].

Um den Prozess der Knochenregeneration zu beschleunigen, wurde versucht die Trägermaterialien zusammen mit vordifferenzierten osteogenen Zellen zu implantieren [Yoshikawa et al., 1996; Okumura et al., 1997; Yoshikawa et al., 2004]. Dabei wurden die aus Hydroxylapatit hergestellten Trägergerüste mit MSC besiedelt und vor der Implantation 2-3 Wochen lang in vitro in einem osteogenen, mit Dexamethason oder  $\beta$ -Glycerophosphat, L-Ascorbat-2-Phosphat und Dexamethason supplementierten Nährmedium kultiviert. So wurde schon vor der Implantation eine gezielte Differenzierung der MSC eingeleitet. Nach subkutaner Implantation im Maus- oder Rattenmodell wurde in diesen vorkultivierten Trägergerüsten eine eindeutig bessere Knochenbildung im Vergleich zu den Trägergerüsten, die mit undifferenzierten MSC besiedelt wurden, festgestellt. Eine derartige Vorkultivierung kann auch in einem Bioreaktor erfolgen [Mueller & Glowacki, 2000; Barthold, 2003].

Eine ganz neue Methode der zellbasierten Verfahren wurde 1998 von Lieberman et al. beschrieben. Es gelang eine immortalisierte Zelllinie des Knochenmarks-Stroma mit einem adenoviralen Vektor, der cDNA für rekombinantes BMP-2 enthält, zu transfizieren. Nach der Implantation im Bereich des Quadrizeps induzierten diese genetisch modifizierten, nun BMP-2 produzierenden Zellen eine heterotope Knochenbildung; gemischt mit demineralisierter Knochenmatrix förderten sie die Heilung eines segmentalen femoralen Defekts im Rattenmodell. Diese Resultate zeigten erstmalig, dass gentherapeutische Methoden Knochen-Tissue-Engineering unterstützen können. Dieses Vorgehen kann dann Anwendung finden, wenn die für die Unterstützung der Regeneration des Knochengewebes verwendeten multipotenten Zellen nicht aus dem Knochenmark, sondern z.B. aus dem Muskel- oder Fettgewebe stammen [Lee et al., 2002; Dragoo et al., 2003; Morizono et al., 2003]. Leider birgt das Verfahren des retrovirusvermittelten Gentransfers auch bestimmte Sicherheitsrisiken. Deshalb konzentriert sich zurzeit das Interesse der Forschung auf die Entwicklung neuer, nicht-viraler Transfektionsmethoden [Jadlowiec et al., 2003].

Offensichtlich ist ein erfolgreiches Knochen-Tissue-Engineering nur dann möglich, wenn mehrere oder sogar alle oben aufgelisteten Verfahren gleichzeitig angewendet werden. Die Abbildung 1.14 zeigt das prinzipielle Schema der extrakorporalen Herstellung von Knochenimplantaten.

### **1.3.2 Potentielle klinische Anwendungen des in vitro hergestellten Knochengewebes**

Die Wiederherstellung von großen Knochendefekten, so genannten „critical sized bone defects“, meist in der diaphysealen Region der Röhrenknochen aber auch in der Wirbelsäule oder im Kiefer-, Gesichtsbereich ist ein ernstes medizinisches Problem. Solche Defekte, die nicht mehr mit traditionellen orthopädischen und chirurgischen Methoden geheilt werden können, treten sowohl als Folge einer akuten Verletzung als auch sekundär bei der

Resektion von gutartigen und bösartigen Knochentumoren, bei angeborenen Fehlbildungen, Infektionen und komplizierten, schlecht heilenden Knochenbrüchen auf. Heutzutage wird zur Wiederherstellung derartiger Knochendefekte oft autologe oder allogene Spongiosa verwendet. Sie wird vorwiegend aus dem Beckenkamm gewonnen und besitzt eine sehr hohe biologische Wertigkeit. Leider weist diese chirurgische Methode bei ihrer Anwendung eine ganze Reihe von Limitierungen auf. Die Transplantatentnahme ist mit zusätzlichem operativem Aufwand und gesteigerter Morbidität des Patienten oder Spenders verbunden. Es ist auch nicht immer möglich die benötigte Menge des Knochengewebes zu gewinnen oder es bestehen Kontraindikationen, die einen derartigen chirurgischen Eingriff überhaupt nicht ermöglichen [Perry, 1999; Wright, 2000]. In vitro hergestelltes Knochengewebe könnte eine reale Alternative zu dieser Methode bieten. Seine Anwendung würde das Infektions- und Abstoßungsrisiko deutlich minimieren und im Falle der allogenen Transplantation den operativen Eingriff unabhängig von den Einschränkungen, die mit der Suche nach einem passenden Spender verbunden sind, machen.

#### **1.4 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit**

Die letzten 30 Jahre der Grundlagenforschung brachten viele neue Einblicke in die physiologischen Prozesse der Entwicklung und Regeneration des Knochengewebes. Sie bereicherten nicht nur das allgemeine Verständnis, sondern lieferten auch die Ausgangsbasis für eine rasante Entwicklung des Knochen-Tissue-Engineerings. Trotz des schnellen Fortschritts der extrakorporalen Knochengewebezüchtung sind aber noch immer viele offene Fragen zu beantworten und zahlreiche praktische Probleme zu lösen, insbesondere auf dem Gebiete der In-vitro-Kultivierung primärer osteogener Zellen und der Herstellung von Implantaten für die Humanmedizin.

Zwei ganz wichtige Aspekte des Knochen-Tissue-Engineerings sind die weitere Verbesserung und Standardisierung des gerade erwähnten Verfahrens zur Kultivierung isolierter humaner osteogener Zellen und die zuverlässige und informative Überwachung dieses Prozesses. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war daher zum einen die Optimierung der Langzeitkultivierung humaner primärer Knochenvorläuferzellen, zuerst in einer 2D-Kultur, und zum anderen die Entwicklung, Erprobung, Anpassung und die anschließende Zusammenstellung einer geeigneten Auswahl an zuverlässigen Analysetechniken, welche den gesamten Verlauf der Osteogenese möglichst informativ und umfangreich widerspiegeln. Der letzte Aufgabebereich beinhaltete auch die Entwicklung und Überprüfung eines Microarrays. Dieser sollte nicht nur die wichtigsten im Knochengewebe exprimierten Gene für Transkriptionsfaktoren, Matrix- und Membranproteine, Zytokine und ihre Rezeptoren, sondern auch bestimmte Kontrollgene, die vorwiegend in anderen Gewebetypen transkribiert werden, umfassen. Der Schwerpunkt bei der Auswahl geeigneter Analysemethoden sollte auf nicht-invasive Verfahren gelegt werden, welche einen Einblick in den Status der

Zellentwicklung ohne die Destruktion der vorliegenden Zellkultur gewährleisten und daher zum Monitoring der In-vitro-Herstellung humaner 3D-Knochenimplantate eingesetzt werden könnten.

Bei der Optimierung der In-vitro-Kultivierung humaner osteogener Zellen sollten im Einzelnen folgende offene Fragen beantwortet werden:

- Welches der am häufigsten verwendeten Basalmedien ist für die Kultivierung humaner osteogener Primärzellen am besten geeignet? Welchen Einfluss üben die verschiedenen Medien auf die Proliferation und Differenzierung dieser Zellen aus?
- Werden Wachstum und Differenzierung humaner primärer Knochenvorläuferzellen durch die Verwendung eines mit fötalem bovinem Serum angereicherten Mediums beeinflusst – wenn ja, in welcher Weise? Ist eventuell ein mit Humanserum supplementiertes Medium für die Kultivierung humaner primärer Knochenvorläuferzellen zu bevorzugen und warum?
- Ist es möglich humane osteogene Primärzellen auch in einem serumreduzierten Medium zu kultivieren? Welche Zusammensetzung und Konzentration der zugegebenen Wachstumsfaktoren ist für die Proliferation und Differenzierung humaner osteogener Zellen am besten geeignet?
- Sind die Erfahrungen, die bei der Kultivierung osteogener Zellen anderer Spezies erworben wurden, auf das humane Kultivierungssystem direkt übertragbar?
- Welche weiteren Möglichkeiten bestehen über die Zusammensetzung des Nährmediums den Verlauf der In-vitro-Osteogenese zu steuern?

Bei der Entwicklung, Erprobung, Anpassung und Auswahl zuverlässiger Analysetechniken standen folgende Fragestellungen im Vordergrund:

- Welche analytischen Methoden sind für eine umfangreiche Untersuchung der In-vitro-Osteogenese am besten geeignet? Warum sind gerade diese Methoden zu bevorzugen?
- Welche Korrelationen bestehen zwischen den getesteten invasiven und nicht-invasiven Analyseverfahren? Durch welche nicht-invasive Analysemethoden könnten die invasiven Methoden definitiv ersetzt werden, um ein zuverlässiges Monitoring der Herstellung von humanen 3D-Knochenimplantaten zu gewährleisten?
- Wie spiegelt das mittels Microarray-Analyse bestimmte Genexpressionsprofil die reale Proteinsynthese und damit die Proliferation und Differenzierung humaner knochenbildender Zellen wider?
- Welche Vorteile könnte der entwickelte gewebespezifische Microarray für das Knochen-Tissue-Engineering bringen?

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Kultivierung humaner primärer Knochenvorläuferzellen**

#### **2.1.1 Verwendetes Zellmaterial**

Für die Untersuchung der Differenzierung humaner Knochenvorläuferzellen unter dem Einfluss verschiedener Hormone, Wachstumsfaktoren und Zytokine und für die Überprüfung der osteokonduktiven und -induktiven Eigenschaften neuer Biomaterialien werden sowohl humane osteogene Zelllinien (z.B., Saos-2, MG-63, G-292, hFOB 1.19) als auch humane primäre Knochenvorläuferzellen verwendet. Die humanen Zelllinien stellen einerseits homogene, schnell expandierende, in gewissem Maße standardisierte und vor allem leicht zugängliche Modellsysteme dar, andererseits wurden die Zellen der meisten humanen osteogenen Zelllinien ursprünglich aus einem Osteosarkom isoliert und sind damit nur bedingt mit den aus einem gesunden Knochengewebe stammenden primären osteogenen Zellen vergleichbar.

Primäre Zellmaterialien, die meistens aus Knochenmark, Spongiosa oder Periost verschiedener Patienten gewonnen werden, weisen dagegen erhebliche Unterschiede in ihrem osteogenen Potential auf, das sowohl von Gesundheitszustand, Erbanlage, Ernährung, Geschlecht und Alter des Patienten als auch von der Methode und dem praktischen Erfolg bei jeder einzelnen Zellisolation abhängig ist [Bruder et al., 1997b; Kaysinger et al., 1997; Voegelé et al., 2000; Muschler et al., 2001]. Um diese Limitierungen größtenteils auszuschließen, wurden für die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Versuche nur zwei unterschiedliche, vorher ausführlich charakterisierte primäre Zellmaterialien eingesetzt. Beide wiesen ein eindeutiges, ausgeprägtes osteogenes Potential auf und wurden freundlicherweise von Dr. Rosemarie Fuhrmann (Zentralinstitut für Biomedizinische Technik der Universität Ulm) und von Prof. Dr. Hubert Mayer (Abteilung für Genregulation und Differenzierung der GBF) zur Verfügung gestellt. Das erste Zellmaterial wurde aus der Spongiosa gewonnen. Diese stammte aus dem proximalen Femurschaft einer weiblichen, 80 Jahre alten Patientin und war während des Einsatzes einer Hüftgelenktotalendoprothese entnommen worden. Die Separation der osteogenen Zellen wurde mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Das zweite Zellmaterial lieferte ein 50 Jahre alter männlicher Patient, mit einer heterotopen Ossifikation. Die Knochenvorläuferzellen aus dem operativ entfernten heterotopen Knochengewebe wurden mit der Methode der differenziellen Adhäsion nach enzymatischer Auflösung der Knochenmatrix isoliert.

Heterotope Ossifikationen sind ektope Knochenbildungen im Weichgewebe, die manchmal bei Patienten mit Kopf-, Rückenmarksverletzungen, Oberschenkelhalsbruch oder nach dem Einsatz einer Hüftgelenksendoprothese auftreten. Die Ätiologie dieser Knochenneubildungen ist bis jetzt nicht eindeutig geklärt. In vivo weist das heterotope Knochengewebe, im Vergleich zu orthotopen Gewebe, eine viel höhere Rate sowohl der

Knochenbildung als auch der Resorption auf. Die erhöhte metabolische Aktivität ist offensichtlich mit der viel größeren Anzahl von Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten pro Volumen-Einheit des heterotopen Knochengewebes verbunden. In vitro zeigen die aus der heterotopen Ossifikation gewonnenen Zellen Eigenschaften, die den „normalen“, aus Knochenmark oder Knochenspongiosa isolierten osteogenen Zellen sehr ähnlich sind. Allerdings ist ihr proliferatives Potential sowie die Kollagen-I-, ALP- und Osteocalcin-Expressionsrate in den meisten Fällen erhöht [Kaysinger et al., 1997; Sell et al., 1998; Chauveau et al., 2004].

### 2.1.2 Für die Kultivierung benutzte Medien, Lösungen und Medienzusätze

Alle Medien und Medienzusätze, die der Hersteller in einer nicht gebrauchsfertigen Form lieferte, wurden mit hochreinem, in Milli-Q-Wasser-Filtrationssystem (Millipore, Schwalbach) aufgearbeitetem Wasser (MilliQ-Wasser) angesetzt und danach durch Filtration über ein 0,1 µm- (Acrocap, Pall, Dreieich) oder 0,22 µm-Filter (Millex®GV, Millipore) sterilisiert. Die Glasgefäße und Kunststoffmaterialien (Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße), die dem Aufbewahren und Vorbereiten der Medien und Medienkomponenten dienten, wurden in einem Autoklaven 30 min lang bei 121 °C und 1 bar sterilisiert.

Für die Kultivierung humaner primären Knochenvorläuferzellen wurden insgesamt vier unterschiedliche Basalmedien benutzt: DMEM (Invitrogen, Karlsruhe), αMEM (Invitrogen), RPMI 1640 (Invitrogen) und ZKT-I (Biochrom, Berlin) (siehe Tab. 2.1). ZKT-I ist ein in der Abteilung Zellkulturtechnik der GBF entwickeltes Medium, das von der Firma Biochrom gemäß der vorgegebenen Formulierung angefertigt wird. In Prinzip stellt es eine Mischung aus Hams's F12 Nutrient Mixture und IMDM dar, die ferner speziell an den Bedarf der Säugetierzellen angepasst ist. Alle Medien wurden von den Herstellern in Pulverform bezogen, direkt vor dem Einsatz entsprechend der Herstellervorschrift angesetzt, über ein 0,1 µm-Filter sterilfiltriert und anschließend auf die Sterilität getestet. Dafür wurden 5,0 ml des jeweiligen Mediums in eine T25-Flasche (Falcon™, Becton Dickinson, Heidelberg) überführt, 72 h lang in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> gelagert und danach unter dem Mikroskop auf Kontaminationen untersucht. Die angesetzten, sterilen Medien wurden im Dunkeln bei 4 °C nicht länger als 4 Wochen aufbewahrt.

Um den Prozess der osteogenen Differenzierung zu fördern, wurden die Basalmedien zusätzlich mit L-Ascorbat-2-Phosphat und β-Glycerophosphat supplementiert. Dexamethason, das dritte die Osteogenese stimulierende Agens, wurde dagegen erst später, während der Zubereitung der serumhaltigen Medien, zugegeben (siehe Tab. 2.2 und Tab. 2.3).

[L-Ascorbat-2-Phosphat](#) (FW=256,1; Sigma, Deisenhofen), das Derivat des L-Ascorbats (Vitamin C), bleibt, im Gegensatz zu L-Ascorbat, im Medium länger erhalten und wird für einen normalen Ablauf der Kollagen I-Synthese benötigt (siehe 1.2.2.3.). Die Konzentration

von 0,2 mmol/l ist ausreichend, um eine optimale Kollagen I-Matrix-Bildung zu erreichen [Peter et al., 1998; Coelho & Fernandes, 2000b].

**Tabelle 2.1**

**Zusammensetzung der verwendeten Basalmedien**

Komponente	DMEM (Kat. Nr. 52100) mg/l	$\alpha$ MEM (Kat. Nr. 1200) mg/l	RPMI 1640 (Kat. Nr. 13018) mg/l	ZKT-I mg/l
<b>Anorganische Salze:</b>				
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	-	-	-	131,5500
CaCl <sub>2</sub>	200,0000	200,0000	-	-
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	-	-	100,0000	-
FeNO <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	0,1000	-	-	-
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	-	-	-	0,4170
KCl	400,0000	400,0000	400,0000	277,0000
MgSO <sub>4</sub>	97,6700	97,6700	48,8400	48,8350
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	-	-	-	61,5000
KNO <sub>3</sub>	-	-	-	0,0380
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	-	-	-	0,0013
NaCl	6400,0000	6800,0000	5500,0000	5800,0000
NaHCO <sub>3</sub>	3700,0000 *	2200,0000 *	2000,0000 *	3610,0000 *
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-	800,00	54,5000
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	-	71,0200
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	125,0000	140,0000	-	-
NaSeO <sub>3</sub>	-	-	-	0,0100
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	-	-	-	0,4315
<b>Andere Komponenten:</b>				
D-Glucose	4500,0000	1000,0000	2000,0000	3650,0000
DL-68-Thiocitinsäure	-	0,2000	-	-
Glutathion (reduziert)	-	-	1,0000	-
Phenolrot	15,0000	10,0000	5,0000	8,1000
HEPES	-	-	5958,00	3000,0000 *
Natriumpyruvat	-	110,0000	-	330,0000
2-Aminoethanol	-	-	-	1,2000
Hypoxanthin	-	-	-	2,0400
Thymidin	-	-	-	0,3650
Linolsäure	-	-	-	0,0420
Putrescin · HCl	-	-	-	0,0805
Liponsäure	-	-	-	0,1050
<b>Aminosäuren:</b>				
L-Alanin	-	25,0000	-	17,0000
L-Asparagin · H <sub>2</sub> O	-	50,0000	-	40,0000
L-Arginin · HCl	84,0000	126,9800	241,8600	100,0000
L-Asparagin (freie Base)	-	-	50,0000	-
L-Asparaginsäure	-	30,0000	20,0000	36,0000
L-Cystin · 2HCl	62,7500	31,0000	65,1500	45,6200
L-Cystein · HCl · H <sub>2</sub> O	-	100,0000	-	17,5000
L-Glutaminsäure	-	75,0000	20,0000	80,0000
L-Glutamin	584,0000	292,0000	300,0000	438,6000
Glycin	30,0000	50,0000	10,0000	30,0000
L-Histidin · HCl · H <sub>2</sub> O	42,0000	41,8800	-	30,0000
L-Histidin (freie Base)	-	-	15,0000	-
L-Hydroxyprolin	-	-	20,0000	-
L-Isoleucin	105,0000	52,4000	50,0000	105,0000
L-Leucin	105,0000	52,4000	50,0000	105,0000
L-Lysin · HCl	146,0000	72,4700	40,0000	120,0000
L-Methionin	30,0000	15,0000	15,0000	36,0000

Komponente	DMEM	$\alpha$ MEM	RPMI 1640	ZKT-I
L-Phenylalanin	66,0000	32,0000	15,0000	50,0000
L-Prolin	-	40,0000	20,0000	37,2500
L-Serin	42,0000	25,0000	30,0000	52,5000
L-Threonin	95,0000	48,0000	20,0000	77,2500
L-Tryptophan	16,0000	10,0000	5,0000	15,0000
L-Tyrosin (Di-Natrium-Salz)	104,2000	52,0900	28,9400	65,0000
L-Valin	94,0000	46,0000	20,0000	70,0000
<b>Vitamine:</b>				
L-Ascorbinsäure	-	50,0000	-	-
Biotin	-	0,1000	-	-
D-Biotin	-	-	0,2000	0,01015
D-Ca Pantothenat	4,0000	1,0000	0,2500	2,2400
Cholinchlorid	4,0000	1,0000	3,0000	8,9800
Folsäure	4,0000	1,0000	1,0000	2,6600
i-Inositol	7,2000	2,0000	35,0000	12,6000
Niacinamid (Nikotinamid)	4,0000	1,0000	1,0000	2,0000
Para-Aminobenzoessäure	-	-	1,0000	-
Pyridoxal · HCl	4,0000	1,0000	1,0000	2,0000
Pyridoxin · HCl	-	-	-	0,0310
Riboflavin	0,4000	0,1000	0,2000	0,2190
Thiamin · HCl	4,0000	1,0000	1,0000	2,1700
Vitamin B <sub>12</sub>	-	1,3600	0,0050	0,6865
<b>Osteogene Supplemente :</b>				
L-Ascorbat-2-Phosphat (Sigma)	51,2200 *	51,2200 *	51,2200 *	51,2200 *
$\beta$ -Glycerophosphat (Sigma)	2160,0020 *	2160,0020 *	2160,0020 *	2160,0020 *

\* - das Supplement ist im Pulvermedium nicht enthalten und wird beim Ansetzen des Basalmediums zugegeben.

[\$\beta\$ -Glycerophosphat](#) (FW=216,0; Sigma) stellt dagegen eine Phosphatquelle dar, die für die Einleitung der Bildung von Hydroxylapatit-Kristallen und Mineralisierung der ECM erforderlich ist [Bellows et al., 1992; Chung et al., 1992; Coelho & Fernandes, 2000b]. In den meisten osteogenen Kultivierungsmedien wird  $\beta$ -Glycerophosphat in der Konzentration von 10 mmol/l angewendet.

Die Zugabe des synthetischen Glucocorticoids [Dexamethason](#) (FW=392,5; Sigma) ist keine grundlegende Voraussetzung (Coelho & Fernandes, 2000b). In der Konzentration von 10 nmol/l wirkt es jedoch osteoinduktiv und fördert die Fortentwicklung und das Aufrechterhalten des osteogenen Phänotyps [Cheng et al., 1994; Peter et al., 1998; Coelho & Fernandes, 2000b; Porter et al., 2003]. Zur Vorbereitung der 0,1 mmol-Stammlösung wurden 67,67 mg der Trockensubstanz (Gehalt des Dexamethasons 58 mg/g) in 100 ml MilliQ-Wasser aufgelöst, über ein 0,22  $\mu$ m-Filter sterilfiltriert, nach Bedarf aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Ferner wurden die Medien mit Humanserum (HS) (Medizinische Hochschule Hannover, Abteilung für Transfusionsmedizin) oder fötalem Kälberserum (FBS) (Sigma) und Antibiotika (Penicillin/Streptomycin, Invitrogen) supplementiert. Die serumreduzierten Medien wurden dabei noch zusätzlich mit humanem Transferrin (Biotest, Dreieich), humanem Albumin (DRK-Blutspendedienst, Springe), humanem Insulin (Invitrogen), Wachstumsfaktoren (PeproTech, Rocky Hill, USA; RELIA**Tech**, Braunschweig) oder BMP-2



(R&D Systems, Minneapolis, USA) angereichert (siehe Tab. 2.2, Tab. 2.3, Tab. 2.4). Um eine möglichst gute Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erzielen, wurden in allen durchgeführten Versuchen HS aus dem gleichen Pool (Blutgruppe AB, Rh+) oder FBS aus der gleichen Charge verwendet.

**Tabelle 2.2****Zusammensetzung der mit 10 % und 15 % Serum angereicherten Medien**

Komponente	Hersteller	Vorbereitung	ml/l
Basalmedium	Invitrogen	Angesetzt, supplementiert mit $\beta$ -Glycerophosphat und L-Ascorbat-2-Phosphat, sterilfiltriert	890,0 (840,0)*
Humanserum (AB, Rh+) oder FBS	MHH, Abteilung für Transfusionsmedizin Sigma	Gepoolt, komplementinaktiviert (30 min bei 56 °C) Komplementinaktiviert (30 min bei 56 °C)	100,0 (150,0)*
Dexamethason	Sigma	0,1 mM-Stammlösung, angesetzt, sterilfiltriert	0,1
Penicillin-Streptomycin-Lösung 10 000 Einheiten/ml Penicillin, 10 000 µg/ml Streptomycin	Invitrogen	Gebrauchsfertig	10,0

\* - die Zahlen in Klammern geben das Volumen in Medien an, die mit 15 % Serum angereichert wurden.

**Tabelle 2.3****Zusammensetzung der serumreduzierten Medien**

Komponente	Hersteller	Vorbereitung	ml/l
Basalmedium	Invitrogen	Angesetzt, supplementiert mit $\beta$ -Glycerophosphat und L-Ascorbat-2-Phosphat, sterilfiltriert	968,0 (958,0)*
Humanserum (AB, Rh+) *	Medizinische Hochschule Hannover, Abteilung für Transfusionsmedizin	Gepoolt, komplementinaktiviert (30 min bei 56 °C)	10,0 (20,0)*
Dexamethason	Sigma	0,1 mM-Stammlösung, angesetzt, sterilfiltriert	0,1
Penicillin-Streptomycin-Lösung 10 000 Einheiten/ml Penicillin, 10 000 µg/ml Streptomycin	Invitrogen	Gebrauchsfertig	10,0
Humanes Transferrin 2,5 %-Lösung	Biotest, Dreieich	Gebrauchsfertig	0,2
Humanes Albumin, 20 %-Lösung	DRK-Blutspendedienst, Springe	Gebrauchsfertig	10,0
Humanes Insulin	Invitrogen	1 %-Stammlösung (pH=2,85), angesetzt, sterilfiltriert	1,0
PDGF-BB	PeproTech	Stammlösung (10 µg/ml), steril angesetzt	1,0
FGF-2 *	PeproTech	Stammlösung (50 µg/ml), steril angesetzt	0,2
EGF	RELIA Tech	Stammlösung (200 µg/ml), steril angesetzt	0,05

\* - Gehalt variiert zwischen 1 % und 2 %; \* - nicht in allen serumreduzierten Medien enthalten;

\* - die Zahlen in Klammern geben das Volumen in Medien an, die mit 2 % Serum angereichert wurden.

Humanserum (HS) wurde nach dem Vereinigen der Seren einzelner Spender zur Komplement-Inaktivierung 30 min lang bei 56 °C erhitzt und danach auf Raumtemperatur abgekühlt. Je 40,0 ml des inaktivierten HS wurden nachdem in sterile 50 ml-

Reaktionsgefäße (Falcon™, Becton Dickinson) überführt und 10 min bei 3000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Ca. 35 ml des klaren Überstands wurden anschließend in neue, sterile 50 ml-Reaktionsgefäße gegeben und bei -20 °C eingefroren. Beim Bedarf wurde HS bei Raumtemperatur langsam aufgetaut und danach im Kühlschrank bei 4 °C nicht länger als 2 Wochen aufbewahrt.

Gleich wie HS, wurde fötales bovines Serum (FBS) nach dem Auftauen 30 min bei 56 °C komplementinaktiviert, auf Raumtemperatur abgekühlt, danach aliquotiert und bei 4 °C gelagert. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Seren wurde vermieden.

Zur Vorbereitung der 1 %-Lösung von humanem Insulin wurde 1 g der Trockensubstanz in 100 ml Wassers aufgenommen. Danach wurde der pH-Wert mit 32%iger HCl graduell auf ca. 2,85 eingestellt, um die Löslichkeit des Insulins zu erhöhen und ein vollständiges Auflösen zu erreichen. Die vorbereitete Lösung wurde über ein 0,22 µm-Filter sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

Zytokine PDGF-BB, FGF-2, EGF und BMP-2 wurden lyophilisiert geliefert und entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet. Zuerst wurden sie in steriler, 10 mM Essigsäure (PDGF-BB, EGF) ), steriler, 4 mM Salzsäure (BMP-2) oder sterilem, 5 mM Tris-Puffer (FGF-2) rekonstituiert und danach mit steriler PBS, die 0,1 % HS als Trägerprotein enthielt, bis zur gewünschten Zwischenkonzentration verdünnt. Die vorbereiteten Stammlösungen wurden ferner aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der rekonstituierten Zytokine wurde ausgeschlossen.

PBS, eine phosphatgepufferte Kochsalzlösung, wird zum Waschen der adhärenen Zellschicht und zur Vorbereitung weiterer Lösungen, die bei der Zellkultivierung benötigt werden, verwendet. PBS enthält 150 mmol/l NaCl, 8 mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mmol/l KCl und 1,5 mmol/l KH<sub>2</sub>PO (pH=7,4). Zur Vorbereitung werden 8 g NaCl (Serva, Heidelberg), 1,07 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Fluka, Buchs, Schweiz), 0,2 g KCl (Fluka) und 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fluka) in 1000 ml MilliQ-Wasser gelöst. Danach wird die vorbereitete Lösung über ein 0,1 µm-Filter sterilfiltriert und weiter bei 4 °C aufbewahrt.

### 2.1.3 Beschichtung von Kulturgefäßen

#### 1 % Gelatine-Lösung:

*Zur Vorbereitung wird 1 g Gelatine (Bloom 225, Sigma) in 100 ml PBS gegeben, durch ein Autoklaviervorgang (30 min bei 121 °C und 1 bar) gelöst und bei Raumtemperatur aufbewahrt.*

Um die Adhäsion humaner primärer Knochenvorläuferzellen zu begünstigen, vor allem nach dem Revitalisieren, wurden die Oberflächen der benutzten Kulturgefäße mit Gelatine beschichtet. Dazu wurde in jedes Kulturgefäß die entsprechende Menge (0,05 ml/cm<sup>2</sup>) einer 1 % Gelatine-Lösung gegeben und das Gefäß solange leicht geschüttelt bis die zu beschichtende Oberfläche gleichmäßig mit der Gelatine-Lösung bedeckt war. Danach wurden die Gefäße 30 min bei Raumtemperatur unter der Clean Bench (LaminAir® Clean Bench, Kendro, Langenselbold) inkubiert, die überflüssige Gelatine-Lösung abgesaugt und

die beschichteten Oberflächen einmal mit steriler PBS gewaschen. Die vorbereiteten Kulturgefäße wurden innerhalb der nächsten 2-4 h verwendet.

#### 2.1.4 Primärkultur und Subkultivierung der Zellen

Trypsin-EDTA-Lösung: *Gebrauchsfertig (Invitrogen). Enthält 0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA·4Na in Hanks gepufferter Salzlösung. Die Lösung wird aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.*

Aus der Spongiosa gewonnenes Zellmaterial wurde 24 h nach der Isolation als Zellsuspension im mit 10 % HS und osteogenen Supplementen angereicherten ZKT-I-Medium (siehe Tab.2.2) angeliefert. Nach Bestimmung von Gesamtzellzahl und Vitalität der Zellen (siehe. 2.2.1.1) wurde die Zellsuspension in T75-Kulturflaschen (Falcon™, Becton Dickinson) überführt und im Brutschrank (Heraeus B16 Inkubator, Kendro) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Das mit HS und osteogenen Komponenten angereicherte ZKT-I-Medium wurde alle drei Tage gewechselt. Beim ersten Medienwechsel wurde der Anteil des Humanserums im Medium auf 15 % erhöht. Das verbrauchte Medium wurde jedes Mal in 50 ml-Röhrchen (Falcon™, Becton Dickinson) gesammelt und 3 min bei 2200 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert (Centrifuge 5403, Eppendorf, Hamburg). Danach wurde der Überstand abgesaugt, die so gewonnene, noch nicht adhärente Fraktion der Zellen in 20 ml des frischen Kulturmediums resuspendiert und der Zellkultur wieder zugefügt.

Nach 4 Tagen wurden in den Kulturen die ersten Kolonien fibroblastenähnlicher Zellen konstatiert. Nach 12 Tagen erreichten die Kulturen einen der Konfluenz nahen Zustand und die Zellen wurden zum ersten Mal passagiert. Um die Zellen vom Boden der Kulturflasche abzulösen, wurde der Kulturüberstand aus jeder T75-Flasche entfernt, die Zellschicht einmal mit 5 ml warmer (37 °C) PBS gewaschen, danach mit 2,5 ml vorgewärmter Trypsin-EDTA-Lösung bedeckt und die Flaschen 3-5 min im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 5 ml des mit 15 % HS angereicherten Kulturmediums gestoppt. Danach wurde die Zellsuspension in ein 50 ml-Röhrchen überführt und 3 min bei 2200 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands wurde das aus einer T75-Flasche gewonnene Zellpellet schonend in 2,5 ml Medium resuspendiert und die Zellsuspension zur Beseitigung von ECM und Zellaggregaten über ein 70 µm-Zellsieb (Falcon™, Becton Dickinson) in ein neues 50 ml-Gefäß gegeben. Danach wurden Zellvitalität und Zellzahl bestimmt und die Suspension in eine T175-Kulturflasche (Falcon™, Becton Dickinson) überführt. Nach Zugabe von 37,5 ml vorgewärmtem frischem Medium wurde die Flasche leicht geschüttelt, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu erreichen, und die Zellkultur in den Brutschrank gelegt. Die anfängliche Zelldichte in den beiden T175-Flaschen entsprach dabei  $1,1 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>. Kurz vor dem Erreichen der nächsten Konfluenz, wurden die Zellen kryokonserviert (siehe 2.1.5).

Aus heterotopen Knochengewebe isoliertes kryokonserviertes Zellmaterial der 2. Passage wurde im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in eine mit Gelatine beschichtete T25-Kulturflasche überführt. Nach der Zugabe von 5 ml mit 10 % HS oder 10 % FBS und osteogenen Supplementen angereicherten ZKT-I-Mediums wurde die Kultur in den Brutschrank gestellt. Am nächsten Tag wurde ein Medienwechsel durchgeführt, um tote Zellen und Reste von Dimethylsulfoxid (DMSO) zu entfernen. Die weitere Subkultivierung der Zellen wurde nach demselben, oben beschriebenen Schema, durchgeführt. Dabei wurden die Zellen immer kurz vor dem Erreichen der Konfluenz im Verhältnis 1:3 passagiert. Die anfängliche Zelldichte entsprach dabei  $0,9 \cdot 10^4$  -  $1,2 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>. In der 6. Passage wurden die Zellen erneut kryokonserviert.

### 2.1.5 Kryokonservierung von Zellen

Kryomedium: Enthält 10 % Kulturmedium, 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma), 80 % HS oder FBS.

Die Kryokonservierung erlaubt es Zellen über einen längeren Zeitraum in ihrem ursprünglichen funktionellen Zustand aufzubewahren und sie erst beim Bedarf zu revitalisieren und zu kultivieren. Der angelegte Pool kryokonservierter humaner Knochenvorläuferzellen ermöglichte somit ein reproduzierbares und vergleichbares Arbeiten mit identischem Ausgangsmaterial. Ähnlich wie beim Subkultivieren wurden die Zellen aus den für die Kryokonservierung vorgesehenen Kulturen zuerst abtrypsiniert und gezählt (siehe 2.1.4 und 2.2.1.1). Nach der Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension erneut bei 2200 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in einem entsprechenden Volumen des Kryomediums resuspendiert. Dabei wurde die Zelldichte auf ca.  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Danach wurde jeweils 1,0 ml der Zellsuspension in Kryoröhrchen (Cryoware<sup>TM</sup>, Nalgene, Rochester, USA) aliquotiert, die Röhrchen in eine Kryobox gelegt (freezing container, Nalgene) und über Nacht bei -70 °C im Gefrierschrank gelagert. Die Abkühlrate lag bei etwa 1 °C pro Minute. Am nächsten Tag wurden die kryokonservierten Zellen in einen Kryotank überführt und in der Gasphase über flüssigem Stickstoff bei ca. -170 °C deponiert.

## 2.2 Biochemische und immunologische Methoden

### 2.2.1 Methoden zur Bestimmung von Zellproliferation und Zelltod

#### 2.2.1.1 Zellzahlbestimmung und Berechnung der Verdopplungszeit

Trypanblau-Lösung: 0,5 g Trypanblau (Merck, Darmstadt) und 0,9 g NaCl (Serva, Heidelberg) werden in 100 ml MilliQ-Wasser gelöst. Danach wird die vorbereitete Lösung über ein 0,22 µm-Filter sterilfiltriert und bei 4 °C aufbewahrt.

Die Zellen aus den für die Zellzahlbestimmung vorgesehenen Kulturen wurden abtrypsiniert, zentrifugiert und das Zellpellet in einem geeigneten Volumen frischen

Mediums aufgenommen (siehe 2.1.4). Das Zellpellet aus einer T75-Kulturflasche wurde z.B. in 2,5 ml Kulturmedium resuspendiert und danach zur Entfernung von ECM und großer Zellaggregate über ein 70 µm-Zellsieb in 50 ml-Röhrchen gegeben. Ferner wurde eine kleine Menge (25-50 µl) der so gewonnenen Zellsuspension 1:2, bei höheren Zellkonzentrationen 1:5, mit Trypanblau-Lösung versetzt. Die vorbereitete Probe wurde in ein Hämozytometer mit einer Einteilung nach Neubauer (improved) gefüllt und die Zellen in den 4 Eckquadraten des Rasters unter dem Mikroskop (Axiovert 120, Zeiss, Jena) bei 100facher Vergrößerung ausgezählt. Da Trypanblau die Plasmamembran lebender Zellen nicht durchqueren kann, das Zytoplasma toter Zellen jedoch blau einfärbt, war eine gleichzeitige Quantifizierung von lebenden und toten Zellen möglich. Die Zahl der vitalen Zellen in 1,0 ml der Zellsuspension wurde nach folgender Formel berechnet:

$$X_v = \frac{X_g - X_t}{4} \cdot VF \cdot 10^4$$

$X_v$  = Zahl der vitalen Zellen in 1 ml der Zellsuspension  
 $X_g$  = Zahl der in 4 Quadranten des Rasters insgesamt ausgezählten Zellen  
 $X_t$  = Zahl der in 4 Quadranten des Rasters ausgezählten toten Zellen  
 $VF$  = Verdünnungsfaktor

Aus den zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten der exponentiellen Wachstumsphase ermittelten Zellzahlen lässt sich die Verdopplungszeit einer Zellkultur berechnen. Die Verdopplungszeit ist ein charakteristisches Merkmal des jeweiligen Zelltyps. Sie erlaubt eine Abschätzung der proliferativen Aktivität der Zellen unter den konkreten Kulturbedingungen und sollte sich nicht wesentlich verändern. Die Verdopplungszeit wurde nach folgenden Gleichungen berechnet:

$$T_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \mu = \frac{\ln(X_1) - \ln(X_0)}{T_1 - T_0}$$

$T_d$  = Verdopplungszeit in Stunden  
 $\mu$  = Wachstumsrate  
 $X_1$  = Zahl der Zellen im Zeitpunkt  $T_1$   
 $X_0$  = Zahl der Zellen im Zeitpunkt  $T_0$   
 $T_1 - T_0$  = Zeitraum von  $T_0$  bis  $T_1$  in Stunden

### 2.2.1.2 Quantitative Bestimmung von Gesamtprotein

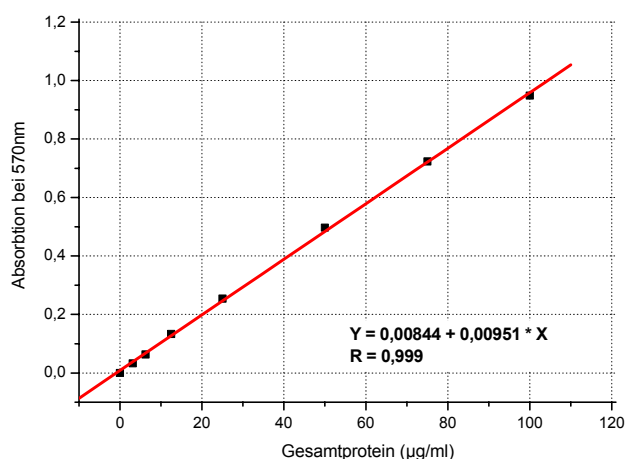
Lysispuffer: Enthält 2 % TritonX-100, 50 mmol/l HEPES und 100 mmol/l NaCl. Zur Herstellung werden 2,0 ml TritonX-100 (Sigma), 1,192 g HEPES (Sigma) und 0,584 g NaCl (Serva) in 100 ml MilliQ-Wasser gelöst. Danach wird die vorbereitete Lösung über ein 0,22 µm-Filter sterilfiltriert und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Färbereagenz: Zu 25 Einheiten des Micro BCA Reagenz MA werden 24 Einheiten des Micro BCA Reagenz MB und 1 Einheit des Micro BCA Reagenz MC gegeben und die Lösung gründlich gemischt. Das grün gefärbte Reagenz bleibt bei Raumtemperatur im Laufe eines Tages stabil.

BSA-Stammlösung: Gebrauchsfertig im Kit vorhanden. Enthält 2,0 mg/ml BSA (Bovine Serum Albumin) in 0,9 % NaCl- und 0,05 % Natriumazid-Lösung.

Die Bestimmung des Gesamtproteins wurde mit dem Micro BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Rockford, IL, USA) durchgeführt. Das hochempfindliche Färbereagenz, das aus den drei Bestandteilen MA, MB und MC vorbereitet wird, enthält BCA (Bicinchoninsäure) und  $\text{Cu}^{2+}$  und ermöglicht eine präzise kolorimetrische Quantifizierung des Gesamtproteins

in wässrigen Lösungen. Im alkalischen Milieu werden die  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen durch die Proteine der Probe zu  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen reduziert. Ferner bilden zwei BCA-Moleküle mit je einem  $\text{Cu}^{1+}$ -Ion einen violettfarbenen Chelatkomplex. Das Absorptionsmaximum dieses wasserlöslichen Komplexes liegt bei 562 nm. Dabei besteht zwischen den Absorptionswerten und der Proteinkonzentration ein linearer Zusammenhang (siehe Abb. 2.1).



**Abb. 2.1**  
Eichgerade zur Bestimmung  
der Konzentration von Gesamtprotein.

Zur Probenaufbereitung wurde das Medium aus den für die Analyse vorgesehenen Kavitäten der 48-Loch-Platte (Falcon™, Becton Dickinson) entfernt und die Zellschicht einmal mit 200 µl vorgewärmter PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 200 µl des Lysispuffers beschichtet und die Kulturplatte 6 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Dieser Zeitraum war für ein vollständiges Lysieren der Zellen ausreichend. Das Zelllysate wurde danach mit Hilfe einer 200 µl-Mikroliterpipette (Eppendorf) gut gemischt, die Zelllysate aus den zugehörigen Kavitäten (jede Probe bestand aus Zelllysaten, die aus zwei Kavitäten zum gleichen Zeitpunkt gewonnen wurden) in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und bei -20 °C eingefroren. Die Bestimmung der Konzentration von Gesamtprotein wurde in allen aus einem Versuch gewonnenen Proben am selben Tag durchgeführt. Dazu wurden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut, kurz auf dem Vortex (Vortex Genie 2, Bender & Hobein, Neu-Ulm) gemischt und 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5415 C, Eppendorf). 160 µl des klaren Überstands wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 1:1 mit MilliQ-Wasser verdünnt. Damit entsprach die Endkonzentration von TritonX-100 in der Probe 1,0 % und war mit der Proteinbestimmung kompatibel. Parallel dazu wurden die für das Erstellen einer Eichgeraden benötigten Standards vorbereitet. Dafür wurde aus der im Kit beiliegenden BSA-Stammlösung eine Verdünnungsreihe mit sinkender Proteinkonzentration (100, 75, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13 µg/ml) in 1:1 mit MilliQ-Wasser versetztem Lysispuffer erstellt. Anschließend wurden dreimal je 100 µl jeder Probe, jedes vorbereiteten Standards und des Blindwerts (1:1 mit MilliQ-Wasser verdünnter Lysispuffer) in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (Falcon™, Becton Dickinson) pipettiert und 100 µl des Färbereagenzes zugegeben. Die Platte wurde

abdeckt und 30 min bei 60 °C unter leichtem Schütteln (350 rpm) inkubiert (Eppendorf Thermomixer comfort, Eppendorf). Danach wurde die Platte 20 min auf Raumtemperatur abgekühlt und die Absorption der Proben und der Standards im ELISA-Reader (Spectralphotometer SLT 340 ATTC, SLT Labinstruments, Tecan, Crailsheim) bei 570 nm gegen den Blindwert vermessen. Im nächsten Schritt wurden die Mittelwerte der Absorption berechnet und mit den Messergebnissen der Standards eine Eichgerade erstellt (Abb. 2.1). Aus der Eichgeraden wurden die Proteinkonzentrationen in den vorliegenden Proben ermittelt und mit dem Verdünnungsfaktor 2 multipliziert.

### 2.2.1.3 Quantitative Bestimmung von Gesamt-DNA zur indirekten Zellzahlermittlung

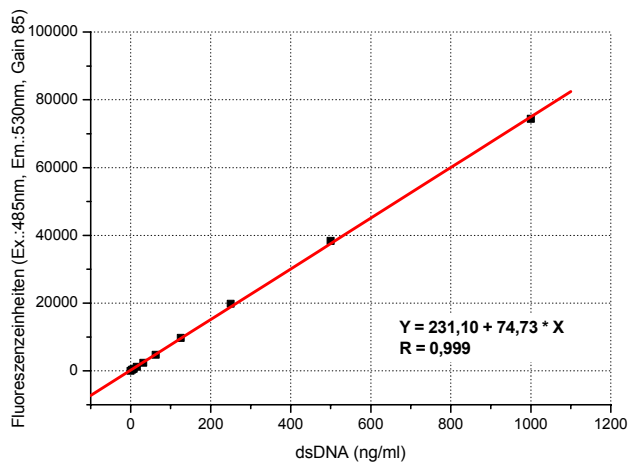
<u>Lysispuffer:</u>	Enthält 0,05 mol/l $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 2,0 mol/l NaCl und 0,002 mol/l EDTA, pH=7,4. Zur Herstellung werden 3,8 g $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Sigma), 23,38 g NaCl (Serva) und 0,149 g EDTA (Sigma) in 100 ml MilliQ-Wasser gelöst. Danach wird der pH-Wert mit HCl auf 7,4 eingestellt, die vorbereitete Lösung über ein 0,22 $\mu\text{m}$ -Filter sterilfiltriert und bei 4 °C aufbewahrt.
<u>Fluoreszenzfarbstoff:</u>	Zur Herstellung werden 100 $\mu\text{l}$ des Farbstoff-Konzentrats (im Kit vorhanden) in einem Plastikgefäß 20-mal mit 19,9 ml des TE-Puffers verdünnt. Das Reagenz kann einige Stunden bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss aufbewahrt werden.
<u>DEPC-Wasser (RNase-, DNase-freies Wasser):</u>	Enthält 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC). Zur Herstellung wird 1 ml DEPC (Sigma) in 999 ml MilliQ-Wasser gegeben. Die Lösung wird kräftig geschüttelt, 12 h bei 37 °C aufbewahrt und danach 15 min bei 100 °C autoklaviert.
<u>Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer):</u>	Enthält 10 mmol/l Tris-HCl und 1 mmol/l EDTA, pH=7,5. Zur Herstellung wird die 20fache-Stammlösung (im Kit vorhanden) 20-fach mit sterilem DNase-freiem DEPC-Wasser verdünnt.
<u>dsDNA-Stammlösung:</u>	Gebrauchsfertig im Kit vorhanden, enthält 100 $\mu\text{g/ml}$ dsDNA in TE-Puffer.

Die Bestimmung der Konzentration von Gesamt-DNA wurde mit dem PicoGreen® dsDNA Quantitation Kit (Invitrogen) durchgeführt. Diese Methode beruht auf dem selektiven Einbau eines spezifischen Fluoreszenzfarbstoffs (PicoGreen® dsDNA quantitation reagent) in die Moleküle doppelsträngiger DNA (dsDNA). Dabei besteht zwischen den Werten der Fluoreszenzintensität und der Konzentration von dsDNA ein linearer Zusammenhang (Abb. 2.2). Im Vergleich zur DNA-Quantifizierung mit dem Hoechst 33258-Fluoreszenzfarbstoff ist diese Methode einfacher zu handhaben und ca. 400-mal sensitiver. Außerdem werden die Messwerte nur minimal von der Gegenwart der einzelsträngigen DNA und der RNA beeinflusst.

Die Zellschicht in den für die DNA-Quantifizierung vorgesehenen Kavitäten der 48-Loch-Platte wurde einmal mit vorgewärmter PBS gewaschen, danach mit 100  $\mu\text{l}$  des kühlen (4 °C) Lysispuffers beschichtet und die Platte 30 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Zelllysate mit Hilfe einer Mikroliterpipette in jeder Kavität gründlich durchgemischt, die Zelllysate aus gepaarten Kavitäten (jede Probe bestand aus den Zelllysaten zweier Kavitäten) in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei -70 °C eingefroren. Um einen vollständigen Aufschluss der Zellkerne zu erreichen, wurden die

Proben vor der Durchführung der DNA-Bestimmung noch einmal bei Raumtemperatur aufgetaut, gemischt und unverzüglich wieder eingefroren.

Die Konzentration der Gesamt-DNA wurde in allen Proben eines Versuchs gleichzeitig bestimmt. Dazu wurden sie ein zweites Mal bei Raumtemperatur aufgetaut, 2 min im Thermomixer (Eppendorf Thermomixer comfort) bei 25 °C und 1300 rpm geschüttelt, 5 min bei 4 °C und 5000 rpm zentrifugiert und dann auf Eis gekühlt. Ferner wurden 40 µl des klaren Überstands in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben und mit 440 µl TE-Puffer versetzt. Dadurch wurde die hohe NaCl-Konzentration in der Probe, die den Einbau des Fluoreszenzfarbstoffs stört, gesenkt. Die 12-mal verdünnten Proben wurden gründlich gevortext und erneut auf Eis gekühlt.

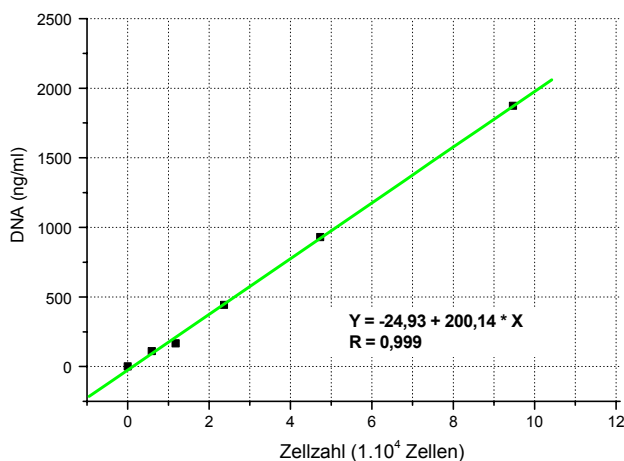


**Abb. 2.2**  
Eichgerade zur Bestimmung der Gesamt-DNA-Konzentration.

Die für die Erstellung einer Eichgeraden benötigten Standards wurden aus der vorhandenen DNA-Stammlösung aufgearbeitet. Dafür wurde die Stammlösung graduell mit Lysispuffer, der vorher 1:11 mit TE-Puffer verdünnt wurde, versetzt. Anschließend wurden dreimal je 120 µl jeder verdünnten Probe, jedes aufgearbeiteten Standards (2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63, 7,81 ng/ml) und des Blindwerts (1:11 mit TE-Puffer verdünnter Lysispuffer) in die Vertiefungen einer für die Fluoreszenzmessungen geeigneten Mikrotiterplatte (ViewPlate™-96, black bottom, PerkinElmer, Boston, USA) pipettiert. Mit einer 8-Kanal-Mikroliterpipette (Brand, Wertheim) wurden möglichst zügig 120 µl des Fluoreszenzfarbstoffs zugegeben und die Intensität der Fluoreszenz nach 3 min in einem Fluoreszenzphotometer (CytoFluor II, Applied Biosystems, Foster City, USA), Anregung bei 485 nm, Emission bei 535 nm, Gain 85) gegen den Blindwert bestimmt. Aus den Dreifachmessungen wurden die Mittelwerte berechnet und aus den Mittelwerten der Standards eine Eichgerade erstellt (Abb. 2.2). Die aus der Eichgeraden errechneten Werte der Gesamt-DNA wurden mit dem Verdünnungsfaktor 24 multipliziert (12fache Verdünnung der Proben zur Senkung der NaCl-Konzentration und 2fache Verdünnung durch die Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffs).



In postkonfluenten Langzeitkulturen der knochenbildenden Zellen ist eine direkte Zellzahlermittlung mit den traditionellen Methoden nicht möglich. Die Bildung und Mineralisierung der ECM macht das Vereinzeln der in ECM eingebetteten Zellen mit Hilfe einer schonenden tryptischen Verdauung praktisch unmöglich. Wenn bei der Quantifizierung der Gesamt-DNA Proben mit einer zuvor bekannten Zellzahl verwendet werden, ist es möglich eine Eichgerade zur indirekten Bestimmung der Zellzahl zu erstellen. Die in der Abbildung 2.3 dargestellte Eichgerade wurde z.B. mit den aus der Spongiosa des humanen Femurs isolierten Zellen angefertigt. Nach der Zelldichtebestimmung ( $9,47 \cdot 10^4$  Zellen/ml) wurde 1,0 ml der gewonnenen Zellsuspension sukzessiv mit Kulturmedium verdünnt um weitere Zellsuspensionen mit den Zelldichten  $4,73 \cdot 10^4$ ,  $2,37 \cdot 10^4$ ,  $1,18 \cdot 10^4$ , und  $0,59 \cdot 10^4$  Zellen/ml vorzubereiten. Danach wurden die Zellsuspensionen 3 min bei 2200 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in 200 µl Lysispuffer aufgenommen. Anschließend wurden die Proben wie oben beschrieben behandelt. Beim Erstellen der Eichgeraden wurden die ermittelten Konzentrationen der Gesamt-DNA mit den entsprechenden Zellzahlen korreliert.



**Abb. 2.3**  
Eichgerade zur indirekten Bestimmung der Zellzahl.

#### 2.2.1.4 Bestimmung der Lactatdehydrogenase(LDH)-Aktivität im Kulturüberstand und die Stabilität der LDH während der Lagerung der Proben

##### Cytotoxicity Detection Kit (Roche, Mannheim)

###### Diaphorase/NAD<sup>+</sup>- Mixtur:

Im Kit vorhandenes Lyophilisat wird in 1 ml MilliQ-Wasser aufgenommen. Nach 10 min wird die Lösung gründlich gemischt, aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

###### Reaktionslösung:

Die Lösung wird direkt vor dem Durchführen der Analyse vorbereitet. Die vorher aufgearbeitete Diaphorase/NAD<sup>+</sup>- Lösung wird im Verhältnis 1:45 mit der im Kit vorhandenen, gebrauchsfertigen Iodotetrazoliumchlorid/ Natriumlactat-Lösung gemischt.

##### Geschwindigkeitsmessung der enzymatischen Reaktion

###### NADH- Lösung:

Enthält 2,7 mmol/l NADH(Sigma). Zur Herstellung werden 9,6 mg NADH in 5 ml Phosphatpuffer gelöst. Die Lösung wird immer frisch angesetzt.

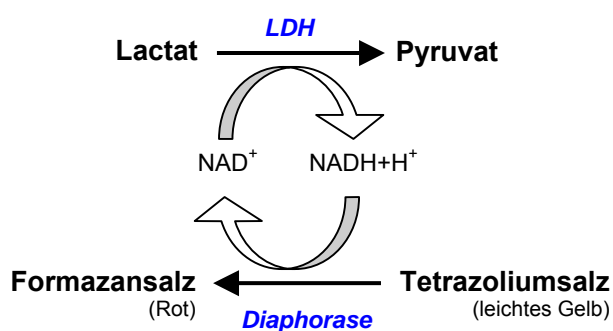
###### Pyruvat-Lösung:

Enthält 10 mmol/l Pyruvat (Sigma). Zur Herstellung werden 0,8806 g Pyruvats in 1000 ml Phosphatpuffer gelöst und bei 4 °C aufbewahrt.

Phosphatpuffer:

Enthält 30 mmol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Sigma), pH=7,4. Zur Herstellung werden 3,6 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  in 1000 ml MilliQ-Wasser gelöst und bei 4 °C aufbewahrt.

Das Absterben von Zellen kann durch zwei Mechanismen erfolgen: Nekrose oder Apoptose. Ein charakteristisches Zeichen der Nekrose ist die Zerstörung der Zellmembran, die meist durch eine extreme Abweichung der physiologischen Bedingungen von ihren Normalwerten (z.B. Hypoxie, Hypothermie) ausgelöst wird. LDH ist ein intrazelluläres Enzym, das im Zytoplasma aller Zelltypen in einer relativ hohen Konzentration präsent ist. Es wird in den Kulturüberstand freigesetzt, wenn die Plasmamembran der Zellen nicht mehr intakt ist und die Zellen lysieren. In In-vitro-Kulturen wird dieser Prozess nicht nur während des nekrotischen Zelltods sondern auch im Verlaufe der sekundären Nekrose (Lysis der apoptotischen Körper (apoptotic bodies) im Endstadium der Apoptose) beobachtet. Die Bestimmung der LDH-Aktivität im Kulturüberstand gibt dementsprechend einen direkten Hinweis auf den Anteil lysierter Zellen bzw. auf die Intensität der sekundären Nekrose in der jeweiligen Kultur.

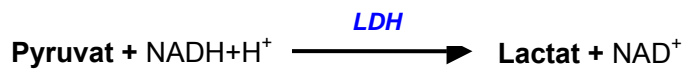


**Abb. 2.4**  
Prinzip der Bestimmung der LDH-Aktivität mit dem Cytotoxicity Detection Kit (Roche).

Die LDH-Aktivität im Kulturüberstand wurde mit dem Cytotoxicity Detection Kit (Roche) gemessen. Das Prinzip dieses Tests basiert auf zwei miteinander gekoppelten enzymatischen Reaktionen (Abb. 2.4). Im Laufe der ersten Reaktion wird Lactat unter LDH-Katalyse zu Pyruvat umgesetzt. Dabei wird  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH} + \text{H}^+$  reduziert. In der nachfolgenden Reaktion transferiert Diaphorase zwei  $\text{H}^+$  von  $\text{NADH} + \text{H}^+$  zum gelb gefärbten Tetrazoliumsalz. Dabei wird es zu einem roten, wasserlöslichen Formazansalz reduziert, das ein relativ breites Absorptionsmaximum um 500 nm aufweist (Abb. 2.4).

Zur Probenvorbereitung wurde der Kulturüberstand aus den zu testenden Kulturen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei Raumtemperatur und 5000 rpm zentrifugiert. Zweimal je 100  $\mu\text{l}$  des klaren Überstands und des jeweiligen Kulturmediums (Blindwert) wurden danach in Kavitäten einer Mikrotiterplatte (Falcon<sup>TM</sup>, Becton Dickinson) pipettiert. Ferner wurden in jede Kavität der Platte 100  $\mu\text{l}$  der Reaktionslösung zugegeben, die Platte ca. 15 s auf dem Thermomixer Comfort bei Raumtemperatur und 600 rpm geschüttelt und exakt 15 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Dann wurde die

Absorption der Proben im ELISA-Reader (Spectralphotometer SLT 340 ATTC, Tecan) bei 492 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) gegen den Blindwert bestimmt.



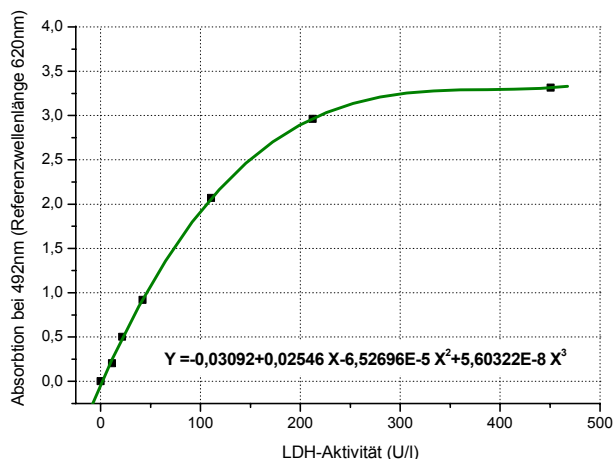
**Abb. 2.5**

Prinzip der Bestimmung der LDH-Aktivität durch die Messung des NADH+H<sup>+</sup>-Verbrauchs.

Diese Methode erlaubt eine einfache, schnelle und simultane Bestimmung der LDH-Aktivität in einer relativ hohen Anzahl der entnommenen Proben. Leider kann das Messergebnis nur als Absorptions- und nicht als Enzymaktivitätswert angegeben werden. Um die Absorptionswerte mit konkreten Aktivitätswerten korrelieren zu können wurde die LDH-Aktivität in einem Satz der Proben, die aus Zellsuspensionen mit bekannter Zellzahl gewonnen waren, zweifach bestimmt: zuerst auf die oben beschriebene Weise, danach mit einer spektralphotometrischen Methode, die die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion ermittelt. Bei diesem alternativen Test wird unter LDH-Katalyse Pyruvat zu Lactat und NADH+H<sup>+</sup> zu NAD<sup>+</sup> umgesetzt (Abb. 2.5). Dabei wird in einem Spektralphotometer (Ultrospec 3100 pro, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) über einen festgelegten Zeitraum (30 s) die Absorption des Reaktionsgemisches bei 340 nm gemessen und damit die Geschwindigkeit, mit der NADH aufgebraucht wird, verfolgt. Aus der Geschwindigkeit des NADH-Verbrauchs berechnet das Gerät automatisch die Aktivität von LDH. Dabei gilt:

$$\text{LDH-Aktivität} = (\text{dC/dt}) \times (\text{Vt/Vs})$$

*dC/dt* = Änderungsrate der NADH-Konzentration im linearen Bereich der Absorptionskurve  
*Vt* = Gesamtvolumen des Reaktionsgemisches  
*Vs* = Volumen der Probe

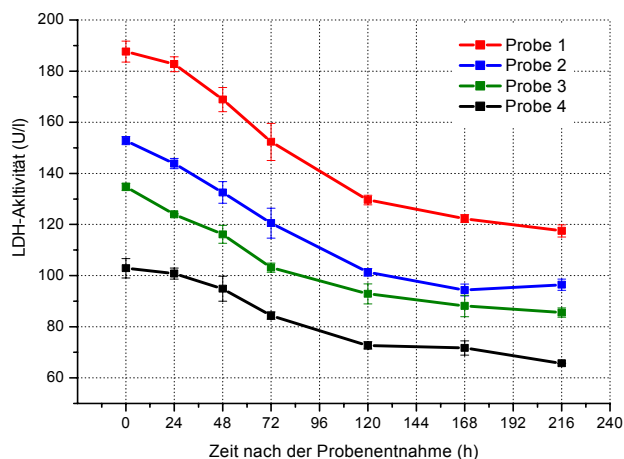


**Abb. 2.6**

Korrelation zwischen den mit dem Cytotoxicity Detection Kit ermittelten Absorptionswerten und der LDH-Aktivität (U/l), die mit dem alternativen Test bestimmt wurde.

Abbildung 2.6 zeigt den Zusammenhang zwischen den mit dem Cytotoxicity Detection Kit gemessenen Absorptionswerten und den Enzymaktivitätswerten, die mit der alternativen Methode bestimmt wurden. Für dieses Beispiel wurden die Proben mit humanen, aus einer heterotopen Ossifikation isolierten Knochenvorläuferzellen vorbereitet. Nach der Zelldichtebestimmung wurde die zu Beginn gewonnene Zellsuspension mit dem

Kulturmedium verdünnt um weitere Zellsuspensionen mit sukzessiv sinkender Zelldichte ( $3,75 \cdot 10^4$ ,  $1,88 \cdot 10^4$ ,  $0,94 \cdot 10^4$ ,  $0,47 \cdot 10^4$ ,  $0,23 \cdot 10^4$  und  $0,12 \cdot 10^4$  Zellen/ml) herzustellen. Danach wurden die vorbereiteten Suspensionen 5 min bei Raumtemperatur und 5000 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in 150 µl (dieses Volumen entspricht der Menge des Kulturmediums in einer Kavität der 48-Loch-Platte) 2%iger TritonX-100-Lösung, die im jeweiligen Kulturmedium aufbereitet wurde, resuspendiert. Anschließend wurden die Proben 4 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Diese Zeit war ausreichend um eine vollständige Lysis der Zellen unter dem Einfluss von TritonX-100 zu erreichen und um Proben mit graduell sinkender LDH-Aktivität zu gewinnen. Ferner wurden die Proben kurz gevortext, 5 min bei Raumtemperatur und 5000 rpm zentrifugiert und der klare Überstand für die beiden Bestimmungen der LDH-Aktivität benutzt. Als Blindwert wurde eine 2%ige TritonX-100-Lösung in Kulturmedium eingesetzt. Für jede Geschwindigkeitsmessung der enzymatischen Reaktion wurden 420 µl Phosphatpuffer, 60 µl Pyruvat-Lösung, 60 µl der jeweiligen Probe und 60 µl NADH-Lösung vermischt. Dabei wurden alle Lösungen schon vorher auf 37 °C temperiert. Die Messungen erfolgten im Spektralphotometer (Ultrospec 3100 pro) bei 37 °C und wurden für jede Probe zweimal durchgeführt. Die erstellte Kurve zeigt eindeutig, dass die Korrelation beider Messungen nur bis zu einem Absorptionswert von maximal 2,5 zulässig ist (Abb. 2.6). Zusätzlich wurde die Stabilität der LDH während einer längerfristigen Lagerung der Proben bestimmt.



Probe	Abnahme der LDH-Aktivität (%)			
	24 h	48 h	72 h	120 h
1	-2,6	-10,0	-18,8	-30,9
2	-5,9	-13,3	-21,1	-33,7
3	-8,0	-13,8	-23,5	-31,1
4	-2,0	-7,8	-18,0	-29,4
Mtw.	-4,6	-11,2	-20,4	-31,3
Stabw.	2,8	2,8	2,5	1,8

**Abb. 2.7**  
Abnahme der LDH-Aktivität im Kulturüberstand während der Lagerung von Proben bei +4°C.

Da das Einfrieren des Kulturüberstands zu einem bedeutenden Verlust der LDH-Aktivität führt, werden die entnommenen Proben meist über einen längeren Zeitraum bei 4 °C aufbewahrt und dann alle gleichzeitig vermessen. Abbildung 2.7 zeigt die Dynamik der Verringerung der LDH-Aktivität in 4 Proben mit unterschiedlichen Ausgangswerten während einer 9-tägigen Lagerung bei 4 °C. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass in den ersten 120 h (5 Tagen) eine schnelle Abnahme der LDH-Aktivität stattfindet. Die LDH hatte in den ersten 48 h nach der Probenentnahme schon  $11,2 \pm 2,8$  % und nach 120 h -  $31,3 \pm 1,8$  % ihrer Aktivität verloren. Da die Aktivität und Stabilität der LDH in verschiedenen

Zelltypen unterschiedlich sein kann, ist es offensichtlich sinnvoll diese Untersuchung für jeden Zelltyp zu wiederholen [Doyle & Griffiths, 1998]. Um möglichst präzise und realitätsnahe Ergebnisse zu erlangen, müssen die Proben unverzüglich oder nicht später als 24 h nach deren Entnahme auf die LDH-Aktivität getestet werden.

### 2.2.1.5 Apoptosebestimmung über die Aktivität der Caspasen 3 und 7

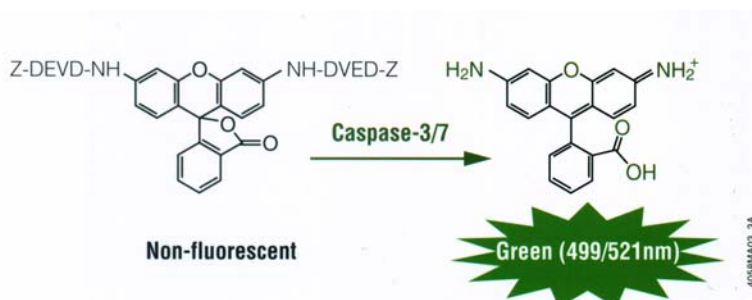
#### Lysispuffer:

Enthält 0,05 mol/l  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 2,0 mol/l NaCl und 0,002 mol/l EDTA, pH=7,4. Zur Herstellung werden 3,8 g  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (Sigma), 23,38 g NaCl (Serva) und 0,149 g EDTA (Sigma) in 100 ml MilliQ-Wasser gelöst. Danach wird die pH-Wert mit HCl auf 7,4 eingestellt, die vorbereitete Lösung über ein 0,22  $\mu\text{m}$ -Filter sterilfiltriert und bei 4 °C aufbewahrt.

#### Substratlösung:

Enthält Caspasen Substrat Z-DEVD-R110 und Apo-One™ Homogeneous Caspase-3/7 Puffer. Beide Reagenzien sind im Assay vorhanden. Zur Herstellung wird das 100fach konzentrierte Substrat in einem Plastikgefäß 1:100 mit dem Puffer verdünnt. Das Reagenz wird bei 4 °C unter Lichtausschluss aufbewahrt und bleibt bis zu 24 h stabil.

Apoptose, der programmierte Zelltod, ist im Gegensatz zur Nekrose ein genetisch gesteuerter Prozess, der meist unter normalen physiologischen Bedingungen auftritt. Apoptose spielt eine bedeutende Rolle während der embryonalen Entwicklung und ist an der Aufrechterhaltung der Gewebekomöostase beteiligt. Sie eliminiert nicht mehr benötigte, nicht funktionsfähige oder kranke Zellen, kann jedoch auch durch äußere Einflüsse eingeleitet werden (Vaux & Strasser, 1996). Apoptose wird von einer Vielzahl von Enzymen schrittweise initiiert. Die wichtigste Enzymgruppe dabei sind die Caspasen (Cysteiny-Aspartasen). Diese interzellulären Proteasen weisen in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Cystein auf und können die Proteine nach der Aminosäure Aspartat schneiden. Die Substrataffinität der Caspasen wird oft von spezifischen, der Schnittstelle benachbarten Aminosäuresequenzen, bestimmt [Vaux & Strasser, 1996]. Caspase-3 und -7 erkennen z.B. die DEVD-Sequenz (Asp(D)-Glu(E)-Val(V)-Asp(D)) und spalten die Proteine auf ihrer C-terminalen Seite.



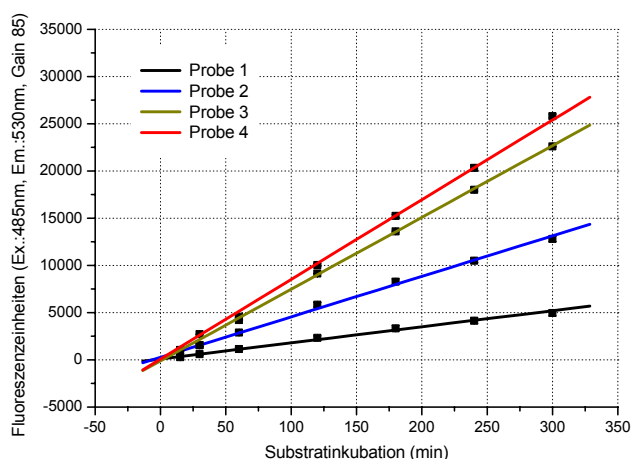
**Abb. 2.8**

**Das Prinzip der Bestimmung von Caspase-3- und -7-Aktivitäten** (übernommen aus dem Apo-One®-Informationsblatt der Firma Promega).

Für den Nachweis apoptotischer Zellen wurde der Apo-ONE™ Caspase-3/7 Assay (Promega, Mannheim) verwendet. Mit diesem Assay wurden die Aktivitäten der Caspasen 3 und 7 sowohl im Kulturüberstand als auch in der adhärennten Zellschicht ermittelt. Das Grundprinzip dieser Bestimmung beruht auf einem fluoreszenzphotometrischen Verfahren

und ist in Abbildung 2.8 dargestellt. Als Substrat für die aktivierten Caspasen 3 und 7 dient in diesem Assay das nicht fluoreszierende Rhodamin 110, bis-(N-CBZ-L-Aspartyl-L-Glutamyl-L-Valyl-L-Asparaginsäure-Amid) (Z-DEVD-R110). Wenn das Substrat zu Proben zugegeben wird, die apoptotische Zellen und damit aktive Caspasen enthalten, spalten die Caspasen 3 und 7 die DEVD-Z Sequenz ab. Dadurch wird Rhodamin 110 freigesetzt, das nach der Anregung bei der Lichtwellenlänge von 485 nm grün fluoresziert. Das Emissionsmaximum liegt bei 521 nm. Dabei ist die Intensität des Fluoreszenzsignals zu der Menge der aktivierten Caspasen direkt proportional.

Für den Nachweis apoptotischer Zellen im Kulturüberstand, wurde dieser aus den zu testenden Zellkulturen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß möglichst vollständig überführt und bei -70 °C eingefroren. Die Proben für die Bestimmung der Apoptose in der adhärennten Zellschicht wurden ähnlich wie bei der Ermittlung der Gesamt-DNA vorbereitet. Die Zellen wurden mit demselben Puffer lysiert und das Zelllysats bei -70 °C aufbewahrt (siehe 2.2.1.3). Die Bestimmung der Aktivität von Caspasen 3 und 7 wurde in allen Proben eines Experiments parallel durchgeführt. Dazu wurden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut und gevortext. Aus der adhärennten Zellschicht gewonnenes Zelllysats wurde danach noch 2 min im Thermomixer bei +25 °C und 1300 rpm geschüttelt. Um die NaCl-Konzentration zu senken, wurden ferner 100 µl jedes Zelllysats in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit 100 µl MilliQ-Wassers versetzt und gründlich gemischt. Danach wurden 2-mal je 50 µl jedes verdünnten Zelllysats, Kulturüberstands oder Blindwerts (jeweiliges Kulturmedium und der 1:1 mit MilliQ-Wasser verdünnte Lysispuffer) in Vertiefungen einer für Fluoreszenzmessungen geeigneten Mikrotiterplatte (ViewPlate™-96, black bottom, PerkinElmer) pipettiert und 50 µl der Substratlösung dazugegeben. Die Platte wurde abgedeckt, 30 s bei Raumtemperatur und 400 rpm auf dem Thermomixer geschüttelt und 5 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte im Fluoreszenzphotometer CytoFluor II (Applied Biosystems, Foster City, USA, Anregung bei 485 nm, Emission bei 535 nm, Gain 85).



**Abb. 2.9**

Ermittlung der Zeit der Substratinkubation. Korrelation zwischen der Dauer der Substratinkubation und Werten der Fluoreszenzintensität in 4 Proben mit unterschiedlicher Caspasen-Aktivität.

Abhängig von der Menge der aktivierten Caspasen, lässt der Assay Inkubationszeiten bis zu 18 h zu. Daher ist es ratsam, die Dauer der Substratinkubation für jedes Kultivierungssystem vorher empirisch zu bestimmen. Abbildung 2.9 präsentiert ein Beispiel der in diesem Zusammenhang vorweg durchgeführten Untersuchungen. Vier Proben (Zellysate), die bei einer Langzeitkultivierung an verschiedenen Tagen gewonnen wurden und unterschiedliche Aktivitäten der Caspasen 3 und 7 aufwiesen, wurden nach der Substratzugabe innerhalb von 5 h siebenmal vermessen. Es wurde eine kontinuierliche Zunahme der ermittelten Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der Dauer der Substratinkubation festgestellt. Da sich auch die nach 4- und 5-stündiger Inkubation ermittelten Fluoreszenzwerte noch im linearen Bereich der Kurve befanden, wurde für die Bestimmung der Caspase-3- und -7-Aktivitäten eine Inkubationszeit von 5 h gewählt.

## 2.2.2 Methoden zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von Zellen

### 2.2.2.1 Bestimmung der Zellvitalität mit dem WST-1-Reagenz

WST-1-Lösung: *Zur Herstellung wird das gebrauchsfertige WST-1-Reagenz 1:10 mit vorgewärmtem Kulturmedium verdünnt.*

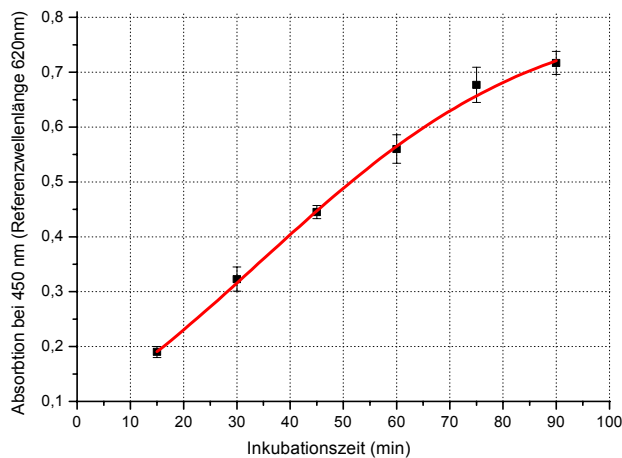
Für die Bestimmung der Zellvitalität wurde das WST-1-Reagenz (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche) eingesetzt. Ähnlich wie bei den alternativen Reagenzien MTT, XTT oder MTS handelt es sich um ein Tetrazoliumsalz ((4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolio]-1,3-Benzen-Disulfonat), das von mitochondrialen Dehydrogenasen gespalten und in dunkelrotes Formazan umgesetzt wird. Der Anstieg der Zahl von metabolisch aktiven Zellen ist mit der Zunahme der gesamten Aktivität von mitochondrialen Dehydrogenasen und damit mit einer höheren Bildungsrate von Formazan nach der WST-1-Zugabe verbunden. Die Menge des gebildeten Formazans wird spektralphotometrisch bestimmt.

Für die Untersuchung der Zellvitalität wurde aus den für die Analyse vorgesehenen Kavitäten einer 48-Loch-Platte der Kulturüberstand entfernt und durch 200 µl 37 °C warme WST-1-Lösung ersetzt. Die Zellkulturen wurden 60 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl des Überstands in Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (Falcon™, Becton Dickinson) überführt und die Bildungsrate des Formazans im ELISA-Reader (Spectralphotometer SLT 340 ATTC, Tecan) bei 450 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) gegen den Blindwert (WST-Lösung im jeweiligen Kulturmedium) bestimmt.

Die geeignete Inkubationszeit nach der Zugabe von WST-1 muss für jedes Kultivierungssystem experimentell geklärt werden. In der Abbildung 2.10 sind die Ergebnisse eines Vorversuchs zur Bestimmung der Dauer der Inkubation dargestellt. In diesem Beispiel wurden die aus einer heterotopen Ossifikation isolierten Zellen in 18 Kavitäten einer 48-Loch-Platte ausgesät und bis zur Konfluenz im αMEM mit 10 % HS und osteogenen Supplementen kultiviert. Danach wurde die Bildungsrate des Formazans



15, 30, 45, 60, 75 und 90 min nach der WST-1-Zugabe in jeweils drei Wiederholungen auf oben beschriebene Weise bestimmt. Für die Ermittlung der Zellvitalität wurde die Inkubationszeit von 60 min gewählt.

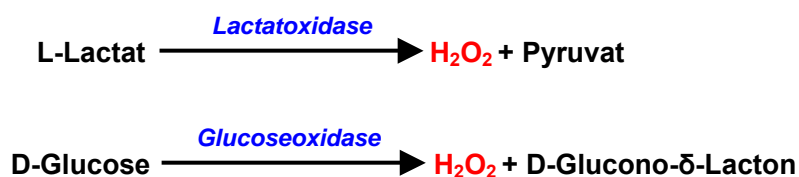


**Abb. 2.10**

Bestimmung der Zeit der Inkubation nach Zugabe von WST-1-Lösung.

### 2.2.2.2 Quantitative Bestimmung von D-Glucose und L-Lactat im Kulturüberstand

Die Bestimmung von D-Glucose- und L-Lactatkonzentrationen im Kulturüberstand wurde mit einem biochemischen Analysator (YSI 2700 SELECT, Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, USA) durchgeführt. Dieses Gerät erlaubt eine parallele Bestimmung von D-Glucose und L-Lactat. Dabei wird D-Glucose an einer mit dem Enzym Glucoseoxidase beschichteten Membran in D-Glucono- $\delta$ -Lacton, L-Lactat an einer mit L-Lactatoxidase beschichteten Membran in Pyruvat umgesetzt (Abb. 2.11). Das dabei ebenfalls gebildete  $H_2O_2$  wird an einer Platinelektrode oxidiert und das auftretende Potential gegen eine Ag/AgCl-Bezugselektrode vermessen. Das Gerät besitzt eine interne Kalibriervorrichtung, die anhand einer Eichlösung (2,5 g/l D-Glucose, 0,5 g/l L-Lactat (Yellow Springs Instruments)) die Konzentration von D-Glucose und L-Lactat in der Probe automatisch berechnen lässt.



**Abb. 2.11**

Prinzip der Bestimmung von D-Glucose- und L-Lactat-Konzentration.

Zur Probenvorbereitung wurden die Kulturüberstände aus jeweils zwei Kavitäten der 48-Loch-Platte in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß zusammenpipettiert und 5 min bei Raumtemperatur und 14000 rpm zentrifugiert. Ca. 150  $\mu$ l des klaren Überstands wurden dann in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bis zur Bestimmung bei -20 °C aufbewahrt. Als Kontrollen dienten Medien, die aus nicht besiedelten Kavitäten derselben



Platten stammten und die gleich den Proben behandelt wurden. Jede Kontrolle und jede Probe wurde dreimal vermessen.

## 2.2.3 Methoden zur Bestimmung von Zelldifferenzierung und Bildung extrazellulärer Matrix

### 2.2.3.1 Quantitative Bestimmung der Kollagen I-Bildung

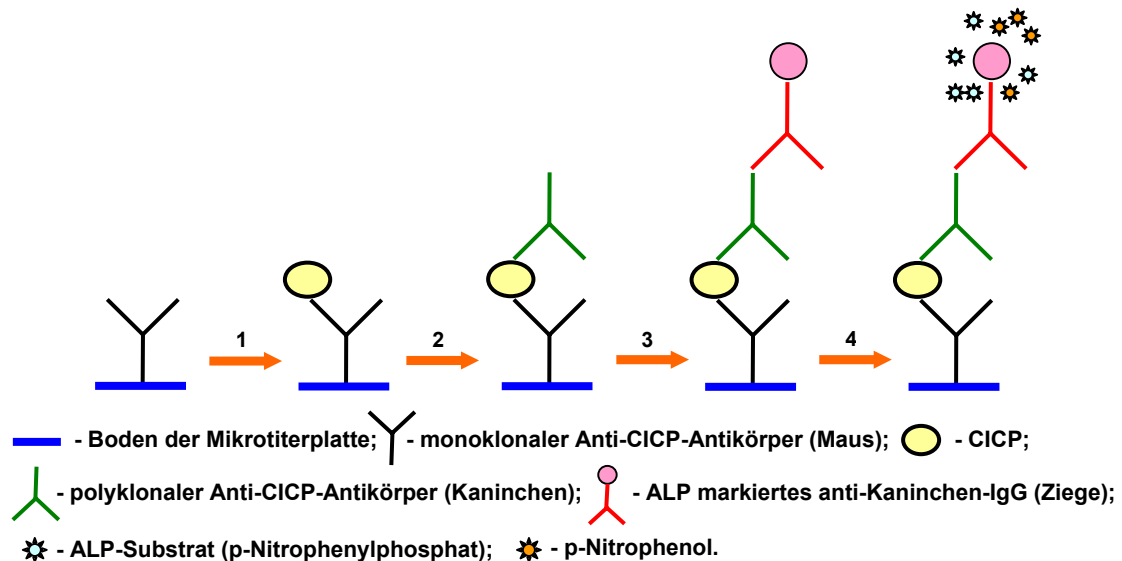
<u>Assaypuffer:</u>	Gebrauchsfertig im Kit vorhanden; wird bei 4 °C aufbewahrt und vor der Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt.
<u>CICP-Standardlösungen:</u>	Enthalten 0, 1, 2, 5, 20, 80 ng/ml CICP. Gebrauchsfertig im Kit vorhanden; werden bei 4 °C gelagert und vor der Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt.
<u>Waschpuffer:</u>	Zur Herstellung wird der 10fach konzentrierte Puffer (im Kit vorhanden) 1:10 mit MilliQ-Wasser verdünnt. Der verdünnte Waschpuffer ist innerhalb von 24 h zu verwenden.
<u>Polyklonaler Anti-CICP-Antikörper (Kaninchen):</u>	Gebrauchsfertig im Kit vorhanden; wird bei 4 °C gelagert und vor der Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt.
<u>Enzymkonjugat (Ziege):</u>	Enthält mit ALP markiertes Anti-Kaninchen-IgG. Zur Herstellung wird in jede Flasche mit dem lyophilisierten Enzymkonjugat (im Kit vorhanden) 7,0 ml verdünnte Waschlösung eingefüllt und das Lyophilisat möglichst ohne Schaumbildung rekonstituiert. Die Lösung wird jedes Mal frisch angesetzt.
<u>ALP-Substratlösung:</u>	Enthält p-Nitrophenylphosphat. Zur Herstellung wird in jede auf Raumtemperatur aufgewärmte Flasche mit dem Substratpuffer (im Kit vorhanden) eine Substrat Tablette (im Kit vorhanden) gegeben. Nach 30-60 min wird die Flasche zur guten Durchmischung kräftig geschüttelt. Die Substratlösung wird jedes Mal neu angesetzt.
<u>Stopplösung:</u>	Enthält 1 N NaOH. Gebrauchsfertig im Kit vorhanden; wird bei Raumtemperatur gelagert.

Die Kollagen I-Bildung wurde mit dem METRA™ CICP Enzymimmunoassay ermittelt (Quidel, San Diego, USA). Dieses Kit stellt einen Sandwich-Enzymimmunoassay im Mikrotiterplattenformat dar und basiert auf der Bestimmung der Konzentration von C-terminalem Propeptid des Prokollagen I (CICP) im Serum oder Kulturüberstand. Das C-terminale Propeptid ist ein trimeres Glycoprotein, das durch Disulfidbrücken stabilisiert wird und ein Molekulargewicht von ca. 100 kDa aufweist. Es wird gleich dem N-terminalen Propeptid von jedem Prokollagen I-Molekül abgespalten, bevor dieses in eine wachsende Kollagenfibrille eingebaut wird (siehe 1.2.2.3). Daher ist die Konzentration des in den Kulturüberstand freigesetzten C-terminalen Propeptids direkt proportional zur Kollagen I-Bildungsrate. Das Prinzip und die einzelnen Arbeitsschritte der Methode werden in Abbildung 2.12 gezeigt.

Bei der Probenvorbereitung wurde der Kulturüberstand aus jeweils zwei Kavitäten der 48-Loch-Platte in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß zusammenpipettiert und 5 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Ca. 150 µl des klaren Überstands wurden danach in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C eingefroren.

Alle aus einer Langzeitkultivierung gewonnenen Proben wurden am selben Tag parallel vermessen. Dazu wurden die eingefrorenen Proben bei Raumtemperatur aufgetaut,

gevortext und 40fach mit Assaypuffer verdünnt. Der optimale Verdünnungsfaktor muss in einem Vorversuch für jedes Kultivierungssystem separat ermittelt werden. Die Absorptionswerte der Proben dürfen den Absorptionswert des Standards mit der höchsten CICP-Konzentration nicht überschreiten (Abb. 2.13).



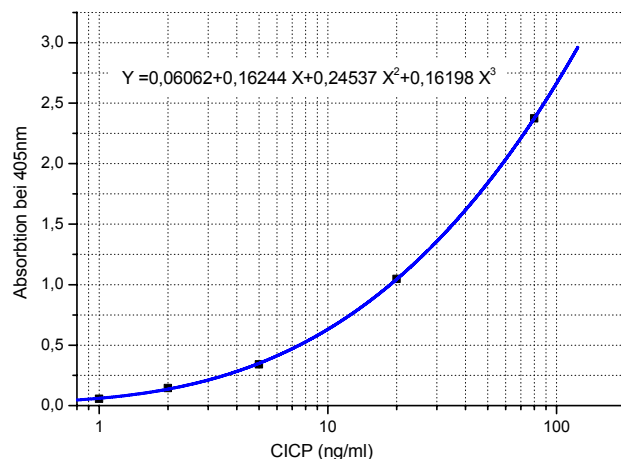
**Abb. 2.12**

Schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte bei der Bestimmung des C-terminalen Propeptids von Prokollagen I im Kulturüberstand.

Danach (Arbeitsschritt 1) wurden zweimal je 100 µl jeder verdünnten Probe, jeder Kontrolle (jeweiliges Kulturmedium, das gleich wie die Proben behandelt wurde) und jedes Standards in die Kavitäten der mit dem monoklonalen Anti-CICP-Antikörper beschichteten Mikrotiterplatte (im Kit vorhanden) pipettiert. Die Platte wurde abgedeckt, in einem Thermomixer 5 min bei 25 °C und 600 rpm geschüttelt und für 2 h bei 25 °C weiter inkubiert. Danach wurde der Inhalt der Kavitäten ausgeleert und jede Kavität mit Hilfe einer Mehrkanalpipette dreimal mit 300 µl des Waschpuffers gewaschen. Nach jedem Waschgang wurde die Platte auf ein absorbierendes Papier gestellt und mehrfach aufgeschlagen. Das vollständige Entfernen der Waschlösung, besonders vor jedem der nächsten Arbeitsschritte, sichert eine gute Reproduzierbarkeit der Messergebnisse.

Im nächsten Arbeitsschritt (2) wurden in jede Kavität 100 µl des polyklonalen Anti-CICP-Antikörpers pipettiert, die Platte 5 min bei 25 °C und 600 rpm geschüttelt und 50 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurden die Kavitäten entleert, auf oben beschriebene Weise erneut dreimal mit 300 µl des Waschpuffers gewaschen und mit jeweils 100 µl der Enzymkonjugatlösung befüllt (Schritt 3). Die Mikrotiterplatte wurde 5 min bei 25 °C und 600 rpm geschüttelt und 50 min bei 25 °C inkubiert. Dann wurden die Kavitäten wieder entleert, dreimal mit dem Waschpuffer gewaschen und nun mit jeweils 100 µl der ALP-Substratlösung befüllt (Schritt 4). Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 25 °C wurden in jede Kavität 50 µl der Stopplösung zugegeben, um die enzymatische Reaktion (siehe 2.2.3.2)

abzubrechen. Nachfolgend wurde die Mikrotiterplatte innerhalb von 15 min im ELISA-Reader (Spectralphotometer SLT 340 ATTC, Tecan) bei 405 nm vermessen und die Absorptionsmittelwerte für Proben, Kontrollen und Standards berechnet. Mit den Mittelwerten der Standards wurde eine Eichgerade erstellt (Abb. 2.13), aus der die CACP-Konzentrationen in den vorliegenden Proben und Kontrollen ermittelt wurden. Die Konzentrationswerte der Proben wurden ferner gegen die entsprechenden Kontrollen verrechnet und mit dem Verdünnungsfaktor 40 multipliziert.



**Abb. 2.13**  
Eichgerade zur Bestimmung der Konzentration von CACP im Kulturüberstand.

### 2.2.3.2 Bestimmung der Aktivität membrangebundener alkalischer Phosphatase

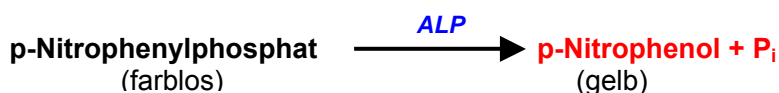
#### ALP-Substratlösung:

Enthält p-Nitrophenylphosphat in Pufferlösung (0,2 mol/l Tris-HCl). Zur Herstellung wird je eine Tablette von Substrat und ALP-Puffer aus dem Sigma Fast™ p-Nitrophenyl-Phosphate Tablet Set (Sigma) in 20 ml MilliQ-Wasser gelöst. Die vorbereitete Lösung wird unter Lichtausschluss bei 4 °C nicht länger als eine Woche aufbewahrt.

#### ALP-Puffer:

Enthält 0,2 mol/l Tris-HCl. Zur Herstellung wird eine Tablette des ALP-Puffers aus dem Sigma Fast™ p-Nitrophenyl-Phosphate Tablet Set (Sigma) in 20 ml MilliQ-Wasser gelöst.

Die Ermittlung der Aktivität membrangebundener ALP, einem der wichtigsten Marker osteogener Differenzierung, beruht auf einer enzymatischen Reaktion, in der das farblose p-Nitrophenylphosphat unter der ALP-Katalyse in ein gelb gefärbtes p-Nitrophenol umgesetzt wird (Abb. 2.14). Die Intensität der Färbung, die spektralphotometrisch gemessen wird, ist direkt proportional zur Aktivität von ALP.



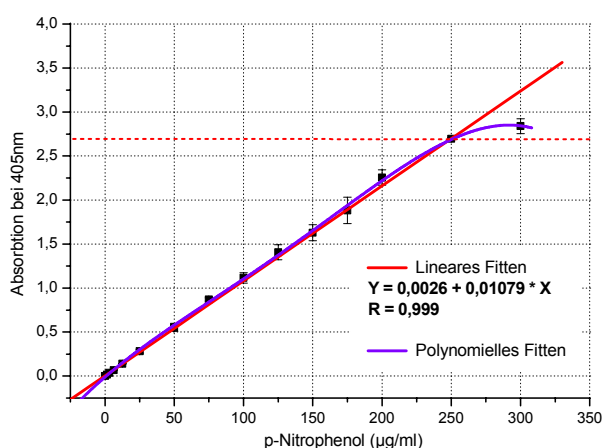
**Abb. 2.14**  
Prinzip der Bestimmung der ALP-Aktivität.

Zur Aktivitätsbestimmung wurde der Kulturüberstand aus zwei für die Analyse vorgesehenen Kavitäten der 48-Loch-Platte möglichst vollständig in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gekühlt. Danach wurden die entnommenen Proben aufgearbeitet und für die Bestimmung der ALP-Aktivität im Kulturüberstand verwendet (siehe 2.2.3.3). Der freigelegte Zellrasen wurde einmal mit 37 °C warmer PBS gewaschen.

Dann wurden in jede Kavität 100 µl auf 37 °C temperierter Substratlösung pipettiert, die Platte in den Brutschrank gelegt und 10-20 min bei 37 °C inkubiert (die optimale Inkubationszeit muss für jedes Zellmaterial empirisch bestimmt werden). Anschließend wurden aus jedem der beiden für die Analyse herangezogenen Kavitäten 50 µl der Reaktionslösung entnommen und in Vertiefungen einer Mikrotiterplatte überführt. Die entnommenen Proben wurden unverzüglich im ELISA-Reader (Spectralphotometer SLT 340 ATTC, Tecan) bei 405 nm gegen den Blindwert (ALP-Substratlösung) vermessen. Die Umrechnung der ermittelten Absorptionswerte in die Enzymaktivitätswerte U/l (1U entspricht derjenigen Enzymmenge, welche unter Standardbedingungen 1 µM des Substrats je Minute umsetzt) erfolgte anhand einer Eichgeraden (Abb. 2.15). Dafür wurden im ALP-Puffer Lösungen mit graduell sinkender Konzentration (300-0 µg/ml) von p-Nitrophenol (Sigma) angesetzt und genauso wie die Proben vermessen. Für die Berechnung der ALP-Aktivität galt:

$$\text{ALP-Aktivität (U/l)} = K_p / 0,1391/T$$

$K_p$  = Konzentration von p-Nitrophenol in der Probe, die aus der Eichgerade ermittelt wird (µg/ml)  
 0,1391 µg/ml = entspricht 1 µM p-Nitrophenols  
 T = Inkubationszeit (min).



**Abb. 2.15**  
 Eichgerade zur Bestimmung der Konzentration von p-Nitrophenol in der Probe

Abbildung 2.15 zeigt, dass in diesem konkreten Fall Absorptionsmessungen nur bis zu einem Wert von ca. 2,75 zuverlässig sind. Wenn dieser Wert überschritten wird, befinden sich die Messwerte nicht mehr im linearen Bereich der Kurve und die Bestimmung der ALP-Aktivität muss wiederholt werden. Die Dauer der Substratinkubation muss bei nachfolgenden Messungen dementsprechend gekürzt werden. Es ist empfehlenswert die oberste Grenze des Messbereichs für jeden ELISA-Reader separat zu bestimmen.

### 2.2.3.3 Bestimmung der Aktivität alkalischer Phosphatase im Kulturüberstand

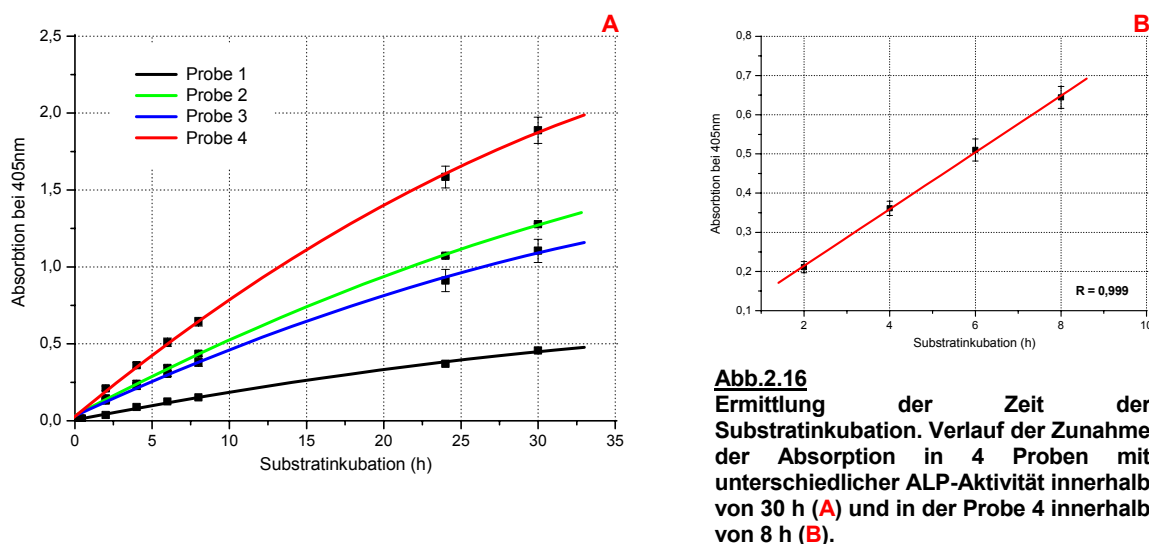
#### 5fach konzentrierte ALP-Substratlösung:

Enthält p-Nitrophenylphosphat in Pufferlösung. Zur Vorbereitung wird je eine Tablette von Substrat und ALP-Puffer aus dem Sigma Fast™ p-Nitrophenyl-Phosphate Tablet Set (Sigma) in 4 ml MilliQ-Wasser gelöst. Die vorbereitete Lösung wird unter Lichtausschluss bei 4 °C nicht länger als eine Woche aufbewahrt.

Zur Probenvorbereitung wurde der bei der Bestimmung der Aktivität von membrangebundener ALP entnommene Kulturüberstand 5 min bei 4 °C und 14000 rpm

zentrifugiert. Danach wurden 150 µl des klaren Überstands in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben und bei -20 °C eingefroren.

Die ALP-Aktivität wurde in allen zu einem Experiment gehörenden Proben am selben Tag bestimmt. Dazu wurden diese aufgetaut, kurz auf dem Vortex gemischt und dreimal je 40 µl jeder Probe und jeder Kontrolle (jeweiliges Kulturmedium) in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte pipettiert. Dann wurden in jede Kavität 10 µl der 5fach konzentrierten Substratlösung zugegeben. Die Platte wurde abgedeckt, 5 min im Thermomixer bei 450 rpm und 37 °C geschüttelt und danach weitere 6-8 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Proben und Kontrollen im ELISA-Reader bei 405 nm bestimmt. Anschließend wurden die Absorptionswerte der Proben gegen die Absorptionswerte der entsprechenden Kontrollen verrechnet, aus der Eichgerade (Abb. 2.15) die Aktivität der ALP ermittelt und mit dem Verdünnungsfaktor 1,25 multipliziert.



Die optimale Inkubationszeit muss dabei für jedes Kultivierungssystem individuell bestimmt werden. Die Abbildung 2.16 zeigt die Ergebnisse eines der vorab durchgeführten Versuche zur Ermittlung der zulässigen Dauer der Substratinkubation. In diesem Vorversuch wurden 4 Proben, die bei einer Langzeitkultivierung an verschiedenen Tagen gewonnen wurden und unterschiedliche ALP-Aktivität aufwiesen, innerhalb von 30 h siebenmal vermessen. Es wurde eine kontinuierliche Zunahme der ermittelten Absorptionswerte in Abhängigkeit von der Dauer der Substratinkubation festgestellt, die jedoch nach ca. 8 h zum Übergang in eine Plateauphase neigte. Für die Bestimmung der Aktivität gelöster ALP wurde daher eine Inkubationszeit von 6-8 h gewählt.

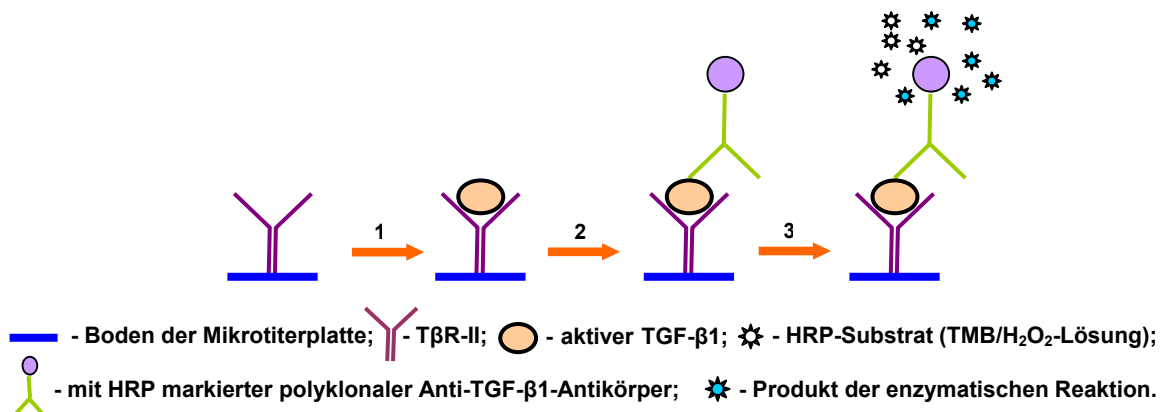
### 2.2.3.4 Quantitative Bestimmung von TGF-β1 im Kulturüberstand

#### Protease-Inhibitor (25faches Konzentrat):

Zur Herstellung wird eine Tablette des Protease Inhibitor Cocktails (complete, EDTA-free, Roche) in 2 ml MilliQ-Wasser gelöst. Die vorbereitete Lösung wird aliquotiert und bei -20 °C nicht länger als vier Wochen aufbewahrt.

<u>1N HCl:</u>	Gebrauchsfertig (Sigma), wird bei Raumtemperatur aufbewahrt.
<u>Neutralisierungslösung:</u>	Enthält 1,2N NaOH und 0,5 mol/l HEPES. Zur Herstellung werden 4,8 g NaOH (Merck) und 11,9 g HEPES (Sigma) in 100 ml MilliQ-Wasser gelöst und bei Raumtemperatur nicht länger als 4 Wochen aufbewahrt.
<u>Calibrator Diluent RD51:</u>	Gebrauchsfertig im Kit vorhanden; wird bei 4 °C gelagert und vor Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt.
<u>TGF-β1-Standard-Stammlösung:</u>	Zur Herstellung werden in das Fläschchen mit dem lyophilisierten TGF-β1 2,0 ml des Calibrator Diluents RD51 gegeben und 15 min bei Raumtemperatur und 250 rpm geschüttelt. Die so vorbereitete Stammlösung (2000 pg/ml) wird für die Herstellung weiterer Standardlösungen benutzt und jedes Mal frisch angesetzt.
<u>Waschpuffer:</u>	Zur Herstellung wird der 25fach konzentrierte Waschpuffer (im Kit vorhanden) 1:25 mit MilliQ-Wasser verdünnt. Der Waschpuffer wird immer frisch angesetzt.
<u>Mit HRP markierter polyklonaler Anti-TGF-β1-Antikörper:</u>	Gebrauchsfertig im Kit vorhanden; wird bei 4 °C gelagert und vor der Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt.
<u>HRP-Substratlösung:</u>	Enthält Tetramethylbenzidin (TMB) und H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (beide Reagenzien sind gebrauchsfertig im Kit vorhanden). Zur Herstellung wird das Color Reagent A (TMB) mit dem Color Reagent B (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Lösung wird jedes Mal neu angesetzt.
<u>Stopplösung:</u>	Enthält 2 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , die gebrauchsfertig im Kit vorhanden ist; wird bei Raumtemperatur gelagert.

Die Quantifizierung von TGF-β1, einem der wichtigsten Wachstumsfaktoren im Knochengewebe, erfolgte mit dem Human TGF-β1 Immunoassay (R&D Systems). Dieses Kit stellt ein Sandwich-Enzymimmunoassay im Mikrotiterplattenformat dar und ist für die Ermittlung der Konzentration von aktivem TGF-β1 im Kulturüberstand, Blutserum oder -plasma geeignet. Abbildung 2.17 zeigt das Grundprinzip und die einzelnen Arbeitsschritte bei der Durchführung dieser Bestimmung.



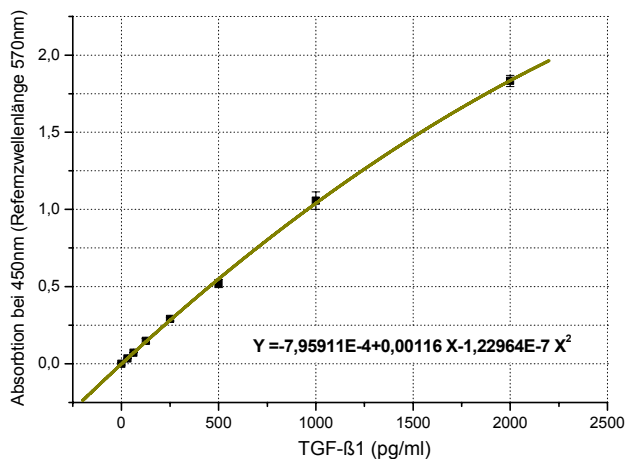
**Abb. 2.17**

Schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte bei der Bestimmung von TGF-β1 im Kulturüberstand.

Zur Probenvorbereitung wurde der Kulturüberstand aus zwei Kavitäten einer 48-Loch-Platte in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß zusammenpipettiert und dann 5 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. 168 µl des klaren Überstands wurden ferner in einem auf Eis vorgekühlten

1,5 ml-Reaktionsgefäß mit 7 µl des Protease-Inhibitors versetzt, gut vermischt und bei -70 °C eingefroren.

Die Quantifizierung von TGF-β1 in allen aus einem Experiment gewonnenen Proben wurde parallel durchgeführt. Die Proben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und kurz gevortext. Da TGF-β1 in latenter Form sekretiert wird (siehe 1.2.2.4), muss zuerst von dem 100 kDa großen Komplex des latenten TGF-β1 das LAP (Latency-Associated Peptide) abgespalten werden. Dazu wurden 100 µl von jeder aufgetauten Probe in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit 20 µl 1 N HCl versetzt, gut vermischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der pH-Wert in den Proben durch die Zugabe von 20 µl der Neutralisierungslösung wieder erhöht. Anschließend wurden die so aktivierten Proben dreifach (Proben mit einem reduzierten Serumgehalt) bzw. sechsfach (Proben mit einem 10%igen Serumgehalt) mit dem Calibrator Diluent RD51 verdünnt.



**Abb. 2.18**

**Eichgerade zur Bestimmung der TGF-β1-Konzentration im Kulturüberstand.**

Die für die Erstellung der Eichgeraden benötigten Standards wurden aus der TGF-β1-Stammlösung (2000 pg/ml) hergestellt. Dazu wurde die Stammlösung sukzessiv mit Calibrator Diluent RD51 verdünnt, um weitere Standardlösungen mit Konzentrationen von 1000, 500, 250, 125, 62,5, und 31,5 pg/ml anzufertigen. Danach wurden zweimal je 200 µl jeder aktivierten und verdünnten Probe, jedes Standards und jeder Kontrolle (Kulturmedien, die gleich den Proben behandelt wurden) in die Kavitäten einer mit dem TGF-β-Rezeptor-Typ-II beschichteten Mikrotiterplatte (im Kit vorhanden) pipettiert, die Platte abgedeckt und 3 h bei 25 °C inkubiert (Arbeitsschritt 1). Nach 3 h wurde der Inhalt der Kavitäten ausgeleert und jede Kavität mit Hilfe einer Mehrkanalpipette dreimal mit 300 µl des Waschpuffers gewaschen. Nach jedem Waschgang wurde die Platte auf ein absorbierendes Papier gestellt und mehrfach aufgeschlagen, um ein vollständiges Entfernen des Waschpuffers zu erreichen. Dann wurden in jede Kavität 200 µl eines mit Meerrettichperoxidase (HRP) markierten polyklonalen Anti-TGF-β1-Antikörpers gegeben, die Platte abgedeckt und 1,5 h bei 25 °C inkubiert (Arbeitsschritt 2).

Anschließend wurden die Kavitäten der Platte ausgeleert, dreimal mit dem Waschpuffer gewaschen und in jede Kavität 200 µl der frisch angesetzten HRP-Substratlösung pipettiert. Die Platte wurde 20 min im Dunkeln bei 25 °C inkubiert und dann in jede Kavität 50 µl Stopplösung zugegeben (Arbeitsschritt 3). Anschließend wurde die Mikrotiterplatte ca. 3 min leicht geschüttelt um eine gleichmäßige Farbveränderung (blau→gelb) zu erzielen und unverzüglich im ELISA-Reader (Spectralphotometer SLT 340 ATTC, Tecan) bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 570 nm vermessen. Danach wurden die Absorptions-Mittelwerte für die Proben, Kontrollen und Standards berechnet. Aus den Mittelwerten der Standards wurde eine Eichgerade erstellt (Abb. 2.18), mit deren Hilfe die TGF-β1-Konzentrationen in den vorliegenden Proben und in den Kontrollen ermittelt wurden. Die Konzentrationswerte der Proben wurden ferner gegen die entsprechenden Kontrollen verrechnet und mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor (4,4 oder 8,7) multipliziert.

## 2.2.4 Methoden zur Bestimmung der Matrix-Mineralisierung

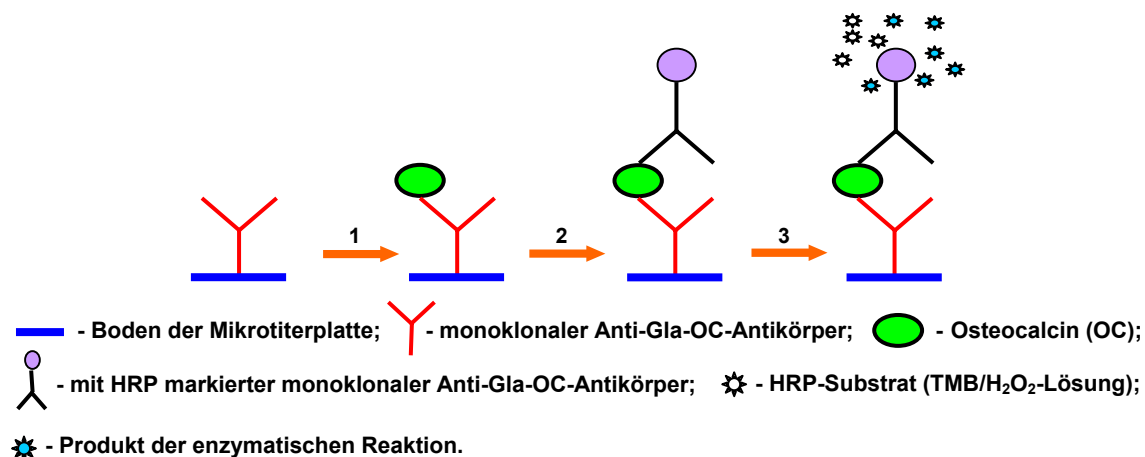
### 2.2.4.1 Quantitative Bestimmung von Osteocalcin im Kulturüberstand

<u>Protease-Inhibitor (25faches Konzentrat):</u>	Herstellung siehe 2.2.3.4.
<u>Probenpuffer (Sample Diluent):</u>	Gebrauchsfertig im Kit vorhanden; wird bei 4 °C gelagert und vor der Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt.
<u>OC-Standard-Stammlösung:</u>	Enthält carboxyliertes OC. Zur Vorbereitung wird in das Fläschchen mit dem lyophilisierten OC 1 ml MilliQ-Wasser gegeben und das Fläschchen 10 min bei Raumtemperatur und 250 rpm geschüttelt. Die vorbereitete Stammlösung (16 ng/ml) wird für die Herstellung von weiteren Standardlösungen benutzt. Bei -30 °C aufbewahrt, bleibt die Lösung 4 Wochen stabil.
<u>Mit HRP konjugierter monoklonaler Anti-Gla-OC-Antikörper:</u>	Zur Herstellung werden in das Fläschchen mit dem lyophilisierten Antikörper-Enzymkonjugat 11 ml MilliQ-Wasser gegeben und 10 min bei Raumtemperatur und 250 rpm geschüttelt. Bei -30 °C aufbewahrt, bleibt der rekonstituierte Antikörper 4 Wochen stabil.
<u>HRP-Substratlösung:</u>	Gebrauchsfertig im Kit vorhanden; enthält Tetramethylbenzidin (TMB) und H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .
<u>Stopplösung:</u>	Enthält 1 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Sigma), gebrauchsfertig, wird bei Raumtemperatur gelagert.

Osteocalcin (OC), das oft auch als Bone-Gla-Protein (BGP) bezeichnet wird, ist ein 5,9 kDa großes, nur aus 49 Aminosäuren aufgebautes Eiweißmolekül. Es enthält drei γ-Carboxyglutaminsäure-Gruppen (Gla-Gruppen) in den Positionen 17, 21 und 24, die dem Protein eine hohe Affinität gegenüber Hydroxylapatit verleihen (siehe auch 1.2.2.3). Osteocalcin wird ausschließlich von Osteoblasten und Odontoblasten synthetisiert und danach größtenteils in die ECM eingebaut. Nur ein kleiner Anteil (ca. 15 %) des neu synthetisierten Osteocalcins gelangt in die Blutbahn oder in den Kulturüberstand. Die Konzentration von Osteocalcin im Kulturüberstand oder Serum kann daher als Indikator für die Aktivität der Osteoblasten und die Intensität des Knochenaufbaus dienen.



Die Bestimmung der Konzentration von Osteocalcin im Kulturüberstand erfolgte mit dem Gla-type Osteocalcin Immunoassay (Takara, Tokyo, Japan). Dieses Kit stellt ebenfalls ein Sandwich-Enzymimmunoassay im Mikrotiterplattenformat dar und wurde für die Ermittlung der Konzentration von carboxylierten Osteocalcin entwickelt. Beide im Assay eingesetzten hochspezifischen monoklonalen Antikörper (Maus) erkennen nur neu synthetisiertes, carboxyliertes Osteocalcin (Gla-OC), nicht aber die decarboxylierte Form des Proteins. Die einzelnen Arbeitsschritte und das Prinzip der Osteocalcin-Bestimmung sind in der Abbildung 2.19 dargestellt.

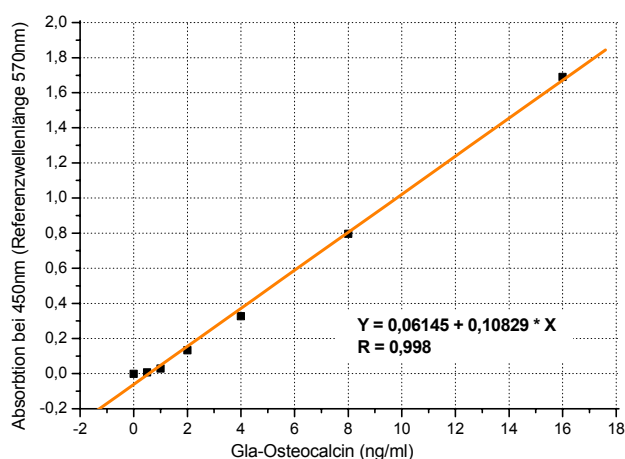


**Abb. 2.19**

Schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte bei der Bestimmung von Osteocalcin im Kulturüberstand.

Zur Probenvorbereitung wurde der Kulturüberstand aus zwei Kavitäten der 48-Loch-Platte in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß zusammenpipettiert und dann 5 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. 168 µl des klaren Überstands wurden anschließend in einem auf Eis vorgekühlten 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit 7 µl des Protease-Inhibitors versetzt, gut vermischt und bis zur Analyse bei -70 °C gelagert. Die Quantifizierung von Osteocalcin wurde in allen aus einer Langzeitkultivierung gewonnenen Proben parallel durchgeführt. Die Proben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und gevortext. Die für die Erstellung der Eichgeraden benötigten Standards wurden aus der Osteocalcin-Stammlösung (16 ng/ml) hergestellt. Dabei wurde die Stammlösung graduell mit dem Probenpuffer verdünnt, um weitere Standardlösungen mit Konzentrationen von 8, 4, 2, 1 und 0,5 ng/ml herzustellen. Danach wurden zweimal je 100 µl jeder Probe, jeder Standardlösung und jeder Kontrolle (Kulturmedien, die gleich den Proben behandelt wurden) in die Kavitäten einer mit monoklonalem Anti-Gla-OC-Antikörper beschichteten Mikrotiterplatte (im Kit vorhanden) pipettiert. Die Platte wurde abgedeckt, in einem Thermomixer 5 min bei 25 °C und 450 rpm geschüttelt und anschließend 2 h bei 25 °C inkubiert (Arbeitsschritt 1). Nach 2 h wurde der Inhalt der Kavitäten ausgeleert und jede Kavität mit Hilfe einer Mehrkanalpipette dreimal mit 300 µl PBS gewaschen. Nach jedem Waschgang wurde die Platte auf ein

absorbierendes Papier gestellt und mehrfach aufgeschlagen, um ein vollständiges Entfernen des Waschpuffers zu erreichen. Dann wurden in jede Kavität 100 µl des mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierten monoklonalen Anti-Gla-OC-Antikörpers pipettiert, die Platte 5 min bei 25 °C und 450 rpm geschüttelt und 1 h bei 25 °C inkubiert (Arbeitsschritt 2). Anschließend wurden die Kavitäten der Platte ausgeleert, erneut dreimal mit PBS gewaschen und in jede 100 µl der HRP-Substratlösung gegeben (Arbeitsschritt 3). Die Platte wurde 15 min im Dunkeln bei 25 °C inkubiert und danach in jede Kavität 50 µl Stopplösung zugefügt. Die Mikrotiterplatte wurde ca. 3 min leicht geschüttelt, um eine gleichmäßige Farbveränderung (blau→gelb) zu erzielen und unverzüglich im ELISA-Reader (Spectralphotometer SLT 340 ATTC, Tecan) bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 570 nm vermessen. Anschließend wurden die Absorptions-Mittelwerte für die Proben, Kontrollen und Standards bestimmt. Mit den Mittelwerten der Standards wurde eine Eichgerade erstellt (Abb. 2.20), mit deren Hilfe die Osteocalcin-Konzentrationen in den vorhandenen Proben und in den Nullkontrollen ermittelt wurden. Die Konzentrationswerte der Proben wurden gegen die entsprechenden Nullkontrollen verrechnet und mit dem Verdünnungsfaktor 1,042 multipliziert.



**Abb. 2.20**  
Eichgerade zur Bestimmung der Konzentration von Osteocalcin im Kulturüberstand.

#### 2.2.4.2 Quantitative Bestimmung der Ca<sup>2+</sup>-Einlagerung in der extrazellulären Matrix mit dem Calcium-Kit

##### 10%ige Ameisensäure:

Zur Herstellung werden 5,26 ml 95%ige Ameisensäure (Sigma) in 100 ml MilliQ-Wasser gelöst und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

##### Färbereagenz:

Enthält Methylthymol und 8-Hydroxyquinolin. Zur Herstellung wird in einem Plastikgefäß das Reagenz 2 mit dem alkalischen Reagenz 3 (beide gebrauchsfertig im Kit vorhanden) im Verhältnis 1:1 gemischt. Das dunkelgrün gefärbte Färbereagenz bleibt bei Raumtemperatur ca. 4 h stabil.

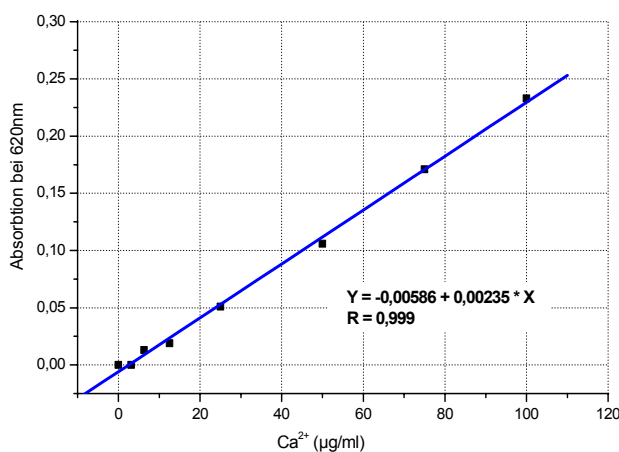
Ca<sup>2+</sup>-Standard-Stammlösung: Gebrauchsfertig im Kit vorhanden; enthält 100 µg/ml Ca<sup>2+</sup>.

Die Ca<sup>2+</sup>-Einlagerung in der ECM wurde mit dem Calcium-Kit (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) ermittelt. Dieses Kit stellt einen Farbstest dar, welcher die Bestimmung von

Calcium mit Hilfe von Methylthymol ermöglicht. Methylthymol bildet im alkalischen Milieu mit  $\text{Ca}^{2+}$  einen blau gefärbten Komplex. Die Intensität der Färbung, die zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration direkt proportional ist (Abb. 2.21), wird spektralphotometrisch bestimmt. Die mögliche Interferenz von  $\text{Mg}^{2+}$  wird dabei durch Mg-bindendes 8-Hydroxyquinolin unterbunden.

Bei der Probenvorbereitung wurde das Kulturmedium aus einer T25-Flasche mit osteogenen Zellen entfernt und die Zellschicht zweimal mit warmer (37 °C) PBS gewaschen. Um die in der ECM eingelagerten Mineralstoffe freizusetzen, wurden in jede Flasche 2,5 ml 10%iger Ameisensäure pipettiert, die Flasche verschlossen und 24 h in einem Schüttler (KL-2, Edmund Bühler GmbH, Hechingen) bei Raumtemperatur und 350 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurde der Inhalt der Flasche möglichst vollständig in ein 15 ml-Reaktionsgefäß (Falcon™, Becton Dickinson) überführt und dann 10 min bei Raumtemperatur und 3000 rpm zentrifugiert. Ca. 2 ml des klaren Überstands wurden in ein neues 15 ml-Reaktionsgefäß gegeben und bei -20 °C eingefroren.

Die Bestimmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts wurde in allen zusammengehörigen Proben parallel durchgeführt. Die Proben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, gevortext und in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß drei- bis sechsfach mit 10%iger Ameisensäure verdünnt. Es ist sinnvoll, Umfang und Notwendigkeit der Verdünnung in einem Vorversuch für jede Zellkultur empirisch zu bestimmen. Dabei dürfen die Absorptionswerte der Proben die des Standards mit der höchsten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (100 µg/ml) nicht überschreiten.



**Abb. 2.21**  
Eichgerade zur Bestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der ECM oder im Kulturüberstand.

Die für die Erstellung einer Eichgeraden benötigten Standards wurden aus der im Kit vorhandenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Standard-Stammlösung (100 µg/ml) angefertigt. Dazu wurde die Stammlösung graduell mit 10%iger Ameisensäure verdünnt und weitere Standardlösungen mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen von 75, 50, 25, 12,5, 6,3 und 3,1 µg/ml erstellt. Anschließend wurden dreimal je 2,5 µl jeder verdünnten Probe, jedes Standards sowie des Blindwerts (10%ige Ameisensäure) in eine Mikrotiterplatte zu 250 µl Färbereagenz pipettiert. Die Platte wurde abgedeckt, in einem Thermomixer 5 min bei 25 °C und 600 rpm geschüttelt

und anschließend noch 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Absorption der Proben und Standards in einem ELISA-Reader bei 620 nm gegen den Blindwert bestimmt und die Mittelwerte der Absorption berechnet. Mit den Absorptions-Mittelwerten der Standards wurde eine Eichgerade erstellt (Abb. 2.21), aus der die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen in den vorliegenden Proben errechnet und mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert wurden.

#### 2.2.4.3 Quantitative Bestimmung der $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Kulturüberstand

Die Bestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Kulturüberstand erfolgte analog zur in 2.2.4.2 beschriebenen Methode. Zur Probenvorbereitung wurde der Kulturüberstand aus zwei Kavitäten der 48-Loch-Platte in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß zusammenpipettiert und 5 min bei Raumtemperatur und 14000 rpm zentrifugiert. Danach wurden ca. 150 µl des klaren Überstands in ein neues Gefäß gegeben und bis zur Analyse bei -20 °C eingefroren. Die Ermittlung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in allen aus einem Experiment gewonnenen Proben wurde parallel durchgeführt. Dazu wurden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut, gevortext und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den vorliegenden Proben auf die oben beschriebene Weise bestimmt. Als Kontrolle wurde das jeweilige Kulturmedium eingesetzt. Anschließend wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den Proben gegen die Konzentration im entsprechenden Kulturmedium verrechnet. Die ermittelte Verminderung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts im Kulturüberstand erlaubte einen Rückschluss auf die Intensität und die Dynamik des Prozesses der Mineraleinlagerung.

#### 2.2.4.4 Bestimmung der $\text{Ca}^{2+}$ -Einlagerung in der extrazellulären Matrix mit dem Calcein-Test

100 % Ethanol:

*Gebrauchsfertig (J.T. Baker, Phillipsburg, USA).*

Calcein-Lösung:

*Zur Herstellung werden 10 mg Calcein (Sigma) in 100 ml MilliQ-Wasser gelöst. Die vorbereitete Stammlösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt und unmittelbar vor dem Gebrauch 20fach mit MilliQ-Wasser verdünnt. Die Endkonzentration des Calceins in der Lösung beträgt 5 µg/ml.*

Eine alternative Methode zur Ermittlung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einlagerung in der ECM stellt der Calcein-Test dar. Dieses fluoreszenzphotometrische Verfahren, welches auf der Ausbildung ionischer Wechselwirkungen zwischen Calcein und in der ECM eingelagertem Hydroxylapatit beruht, erlaubt eine sensible, semiquantitative Bestimmung des Mineralisierungsgrads osteogener Zellkulturen [Hale et al., 2000].

Bei der Durchführung der Bestimmung wurden aus den für die Analyse vorgesehenen Kavitäten der 48-Loch-Platte das Medium abgesaugt, die Zellschicht einmal mit warmer PBS gewaschen, dann mit 100 µl eiskaltem 100%igen Ethanol beschichtet und 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde das Ethanol entfernt, die Zellschicht dreimal mit 200 µl sterilem MilliQ-Wasser gewaschen, in jede Kavität 100 µl Calcein-Lösung

pipettiert und die Platte über Nacht bei 4 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Calcein-Lösung entfernt, der Zellrasen dreimal mit 200 µl kalter PBS gewaschen und anschließend mit 200 µl PBS beschichtet. Die Messung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte im CytoFluor II (Applied Biosystems, Anregung bei 485 nm, Emission bei 535 nm, Gain 70). Die gewonnenen Rohdaten wurden gegen einen Blindwert verrechnet, der aus zwei gleich behandelten, aber unbesiedelten Kavitäten ermittelt wurde.

### 2.2.5 Test zur Bestimmung der biologischen Aktivität von BMP-2

Das für die Supplementierung der Kulturmedien verwendete rekombinante humane BMP-2 (rhBMP-2), wurde in genetisch modifizierten *Escherichia coli* produziert und freundlicherweise von L. F. Vallejo und Dr. U. Rinas aus der GBF in gereinigter und renaturierter Form zur Verfügung gestellt. Die Konzentration von BMP-2 in den einzelnen Produktionschargen war unterschiedlich und lag im Bereich von 0,244 bis 1,75 mg/ml. Da einzelne rhBMP-2-Chargen deutliche Unterschiede in ihrer Aktivität aufwiesen, war es wichtig, die biologische Aktivität jeder neu hergestellten Charge zu überprüfen.

Die Überprüfung der biologischen Aktivität von rhBMP-2 erfolgt in vitro und basiert auf der einzigartigen Eigenschaft osteogener BMPs selbst in solchen Zellen, die ursprünglich nicht zur Knochenbildung befähigt sind, eine Expression knochenspezifischer Gene (z.B. *Cbfa1/Osf2*, ALP) hervorzurufen (siehe auch 1.2.2.4). In murinen Myoblasten der C2C12-Zelllinie induziert BMP-2 z.B. eine ausgeprägte, von der Dosis des Differenzierungsfaktors abhängige ALP-Expression (Abb. 2.22). Diese Zelllinie wird daher häufig in Bioassays zur Aktivitätsbestimmung von rhBMP-2 eingesetzt.

Nach dem Revitalisieren wurden die C2C12-Zellen über eine Passage in DMEM, das mit 10 % FBS und Antibiotikum (100 Einheiten/l Penicillin, 100 µg/l Streptomycin) angereichert wurde, jedoch keine osteogenen Komponenten enthielt, kultiviert. Kurz vor dem Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen - wie bei der Subkultivierung - abtrypsinisiert (siehe 2.1.4), in frischem, mit 10 % FBS supplementiertem Medium aufgenommen und in einer Zelldichte von  $9,3 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> ( $7 \cdot 10^4$  Zellen/Kavität) in Kavitäten einer 48-Loch-Platte ausgesät. Danach wurde die Platte 3 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Dieser Zeitraum war ausreichend, um eine vollständige Adhäsion der Zellen zu erreichen. Dann wurde das Medium entfernt, die adhärente Zellschicht einmal mit warmer (37 °C) PBS gewaschen und in jede Kavität 100 µl des mit nur 2 % FBS und Antibiotikum angereicherten DMEM gegeben. Die Loch-Platte wurde für 1 h in den Brutschrank gelegt, damit eine Anpassung der Zellen an das serumreduzierte Medium erfolgen konnte. Anschließend wurde das serumreduzierte Medium durch die BMP-2-haltigen, serumreduzierten Medien ersetzt. Als Positivkontrolle wurde in rekombinanten CHO-Zellen hergestelltes rhBMP-2 (R&D Systems, Minneapolis, USA.) verwendet. Tabelle 2.4 zeigt das

prinzipielle Schema des Bioassays und die Verteilung der eingesetzten Medien auf der mit C2C12-Zellen besiedelten 48-Loch-Platte.

**Tabelle 2.4**

**Schema des Bioassays und die Verteilung der rhBMP-2-haltigen Medien auf der 48- Loch-Platte**

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	PBS	DMEM	0,0 µg/ml	0,5 µg/ml	1,0 µg/ml	2,0 µg/ml	3,0 µg/ml	PBS
C	PBS	DMEM	0,0 µg/ml	0,5 µg/ml	1,0 µg/ml	2,0 µg/ml	3,0 µg/ml	PBS
D	PBS	4,0 µg/ml	5,0 µg/ml	0,5 µg/ml	1,0 µg/ml	2,0 µg/ml	PBS	PBS
E	PBS	4,0 µg/ml	5,0 µg/ml	0,5 µg/ml	1,0 µg/ml	2,0 µg/ml	PBS	PBS
F	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

**PBS** - unbesiedelte, nur mit PBS beschichtete Kavitäten;

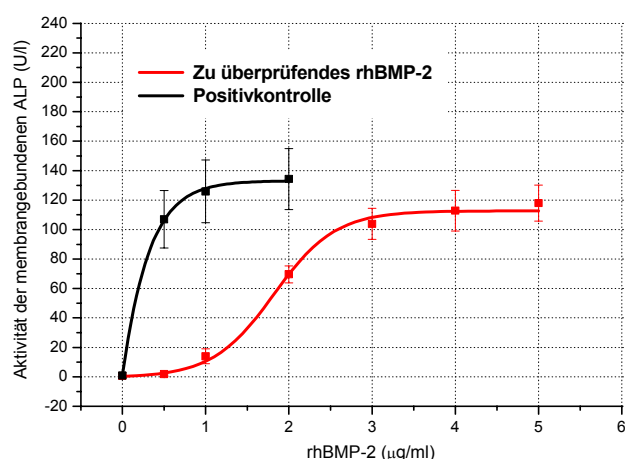
**DMEM** – unbesiedelte Kavitäten, die mit 2 % FBS angereichertes DMEM enthalten;

**0,5 µg/ml** - **Positivkontrolle**, besiedelte Kavitäten; das Kulturmedium enthält 0,5 µg/ml des in CHO-Zellen produzierten BMP-2 (R&D Systems);

**1,0 µg/ml** - **Positivkontrolle**, besiedelte Kavitäten; DMEM enthält 1,0 µg/ml des in CHO-Zellen produzierten BMP-2 (R&D Systems);

**2,0 µg/ml** - **Positivkontrolle**, besiedelte Kavitäten; DMEM enthält 2,0 µg/ml des in CHO-Zellen produzierten BMP-2 (R&D Systems);

**0,0 µg/ml bis 5,0 µg/ml** - besiedelte Kavitäten; DMEM enthält 0,0-5,0 µg/ml des zu überprüfenden BMP-2.



**Abb. 2.22**

Typischer Verlauf der Zunahme der ALP-Aktivität in murinen Myoblasten (C2C12-Zelllinie) in Abhängigkeit von der rhBMP-2-Konzentration.

Zur Herstellung der BMP-2-haltigen Medien wurde zuerst DMEM mit 5 µg/ml rhBMP-2-angesetzt. Dazu wurde ein entsprechendes Volumen des zu überprüfenden BMP-2 (gelöst in MES-Puffer, pH=5,0) in 4 ml des mit 2 % FBS und Antibiotikum angereicherten DMEM aufgenommen und über ein 0,22 µm-Filter (Millex®GV, 0,22 µm, Millipore) sterilfiltriert. 2,5 ml des Filtrats wurden danach mit sterilem, serumreduzierten DMEM verdünnt, um weitere Medien mit rhBMP-2-Konzentrationen von 4, 3, 2, 1 und 0,5 µg/ml herzustellen. Das von R&D Systems produzierte, lyophilisierte rhBMP-2 (10 µg) wurde zuerst in 100 µl steriler 4 mM Salzsäure, die 0,1 % HS als Trägerprotein enthielt, rekonstituiert. Danach wurden 40 µl der hergestellten Lösung in 1960 µl des mit 2 % FBS und Antibiotikum supplementierten DMEM aufgenommen und damit ein Kulturmedium mit der rhBMP-2-Konzentration von 2 µg/ml angefertigt. 1 ml dieses Kulturmediums wurde für die Herstellung weiterer Medien mit BMP-2-Konzentrationen von 1 und 0,5 µg/ml genutzt. Nach der Zugabe der rhBMP-2-

haltigen Medien wurde die 48-Loch-Platte 3 Tage im Brutschrank unter Standardbedingungen inkubiert und anschließend die Aktivität der membrangebundenen ALP (siehe 2.2.3.2) bestimmt. Abbildung 2.22 zeigt einen typischen Verlauf der Zunahme der Aktivität membrangebundener ALP in C2C12-Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen von rhBMP-2 behandelt wurden.

## 2.3 Histologische Färbetechniken

### 2.3.1 Alkalische-Phosphatase-Färbung

100 % Ethanol:                      *Gebrauchsfertig (J.T. Baker).*

Färbereagenz:                      *Enthält 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat(BCIP) und Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT). Zur Herstellung wird eine Sigma Fast™ BCIP/NBT Tablette (Sigma) in 10 ml MilliQ-Wasser gelöst. Die vorbereitete Lösung wird unter Lichtausschluss bei 4 °C nicht länger als eine Woche aufbewahrt.*

Die Färbung basiert auf einer von ALP katalysierten Farbreaktion, in der das farblose 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP) zu einem blauen Indigo konvertiert wird. Die vier dabei freigesetzten  $H^+$  reduzieren das zur Farbverstärkung eingesetzte Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT) zum purpurnen Diformazan. Beide Farbstoffe fallen in der unmittelbaren Nähe der ALP-Moleküle aus und färben die Umgebung der ALP-positiven Zellen dunkelviolett an.

Bei der Durchführung der Färbung wurden aus den für die Analyse vorgesehenen Kavitäten einer 48-Loch-Platte das Medium entfernt, die Zellschicht einmal mit warmer PBS gewaschen, mit 100  $\mu$ l eiskaltem 100%igen Ethanol überschichtet und 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde das Ethanol entfernt, der Zellrasen dreimal mit 200  $\mu$ l sterilem MilliQ-Wasser gewaschen und in jede Kavität 100  $\mu$ l Färbereagenz gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 37 °C wurde die Reaktion durch Entfernen des Reagenz und dreimaliges Waschen mit sterilem Wasser abgebrochen. Danach wurden die Zellen unter dem Mikroskop (Axiovert 120, Zeiss) bei 100facher Vergrößerung betrachtet und mit der Digitalkamera (Digital Camera DXN 1200F, Nikon, Düsseldorf) photographiert.

### 2.3.2 Von-Kossa-Färbung zur Visualisierung der Mineraleinlagerung in der extrazellulären Matrix

100 % Ethanol:                      *Gebrauchsfertig (J.T. Baker).*

Silbernitratlösung:                      *Enthält 5 %  $AgNO_3$ . Zur Vorbereitung werden 5 g  $AgNO_3$  (Merck) in 100 ml MilliQ-Wasser gelöst. Die vorbereitete Lösung wird unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur aufbewahrt.*

Entwicklerlösung:                      *Enthält 5 %  $Na_2CO_3$  und 0,2 % Formaldehyd (Riedel de Haën). Zur Vorbereitung werden 5 g  $Na_2CO_3$  (Merck) und 0,55 ml eines 36,5%igen Formaldehyds (Sigma) in 100 ml MilliQ-Wasser gelöst. Die vorbereitete Lösung wird unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur aufbewahrt.*

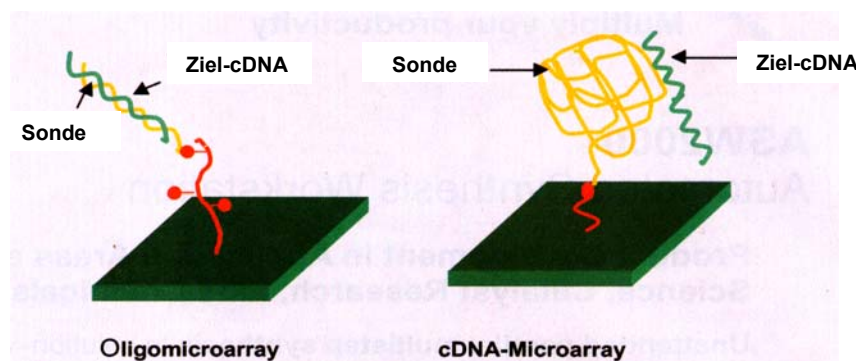
Bei der Von-Kossa-Färbung wird das in der ECM eingelagerte Calcium anfangs in seinen Verbindungen gegen Silberionen ausgetauscht, die in einer nachfolgenden Reaktion zu

metallischem Silber reduziert werden. Dadurch entsteht in den Mineralisierungszonen eine dunkelbraune bis schwarze Färbung.

Bei der Durchführung der Analyse wurde aus den für die Färbung vorgesehenen Kavitäten einer 48-Loch-Platte das Medium entfernt, die Zellschicht einmal mit warmer PBS gewaschen, mit 100 µl eiskaltem 100%igen Ethanol beschichtet und 30 min fixiert. Anschließend wurde das Ethanol entfernt, die Kavitäten dreimal mit 200 µl sterilem MilliQ-Wasser gewaschen und die Zellschicht mit 100 µl Silbernitratlösung bedeckt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss wurde die Lösung entfernt und die Kavitäten erneut dreimal mit MilliQ-Wasser gewaschen. Danach wurden in jede Kavität 100 µl Entwicklerlösung (Reduktionslösung) gegeben. Je nach Intensität der Färbung wurde die Reaktion nach ca. 1-2 min durch das Entfernen der Entwicklerlösung und dreimaliges Waschen mit sterilem Wasser gestoppt. Im Anschluss wurde die Zellschicht unter dem Mikroskop bei 100facher Vergrößerung betrachtet und mit der Digitalkamera photographiert.

## 2.4 Microarray-Analyse der Genexpression

Microarrays, oft auch als Biochips bezeichnet, bestehen aus planen Trägermaterialien, wie z.B. aus Cellulosemembranen, Kunststoffpolymeren, meistens jedoch aus Glas, auf deren aktivierten Oberflächen mit Hilfe spezieller Drucker Fängermoleküle, die so genannten Sonden, gerichtet immobilisiert werden.



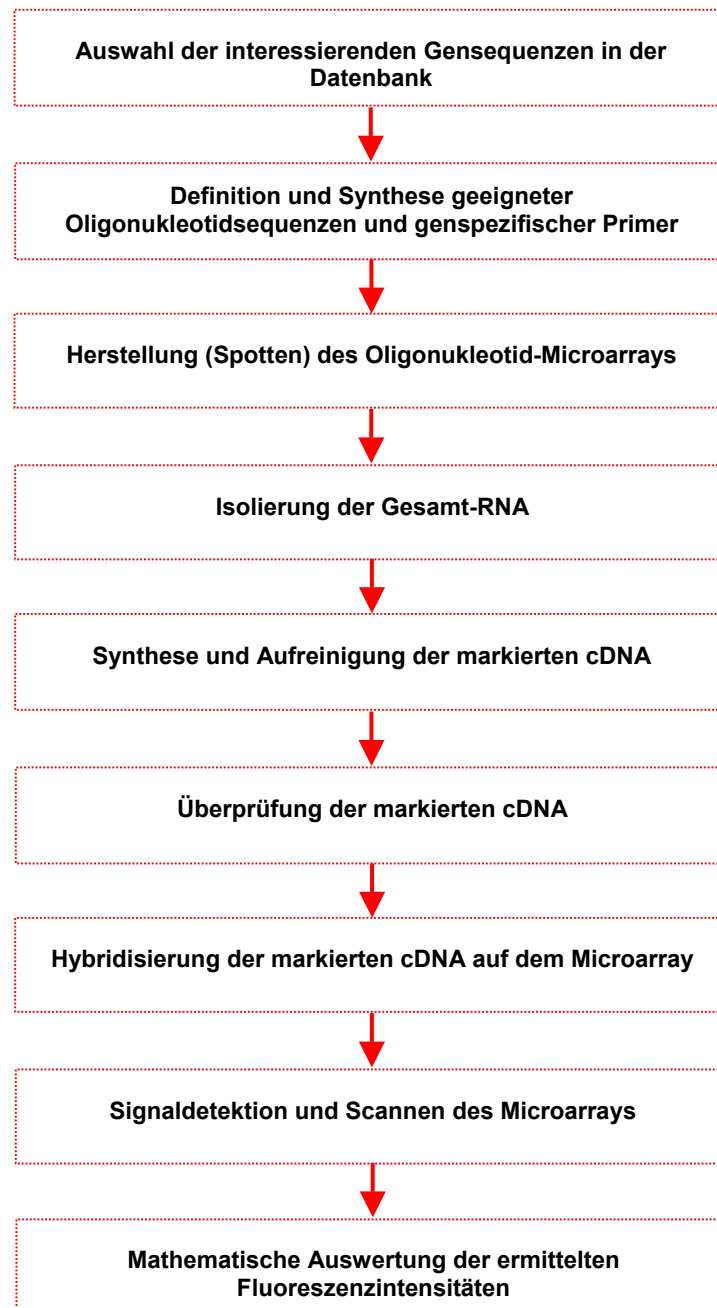
**Abb. 2.23**

**Grundprinzip der DNA-Microarray-Analyse und zwei Arten von DNA-Microarrays.** Die Glasoberfläche der Arrays enthält funktionelle Gruppen (—), die eine gerichtete, meist kovalente Anbindung der Sonden (kurze Oligonukleotide oder bis ca. 5000 Basen lange cDNA-Moleküle) gewährleisten [übernommen aus Wagner S., 2001].

Als Sonden können praktisch alle Moleküle dienen, die zu einer spezifischen Wechselwirkung mit anderen Molekülen fähig sind. Neben DNA-Microarrays, auf deren Oberfläche cDNA-Fragmente (cDNA-Microarrays) oder kurze Nukleotidsequenzen (Oligonukleotid-Microarrays, Oligomicroarrays) bestimmter Gene fixiert sind (Abb. 2.23), gibt es auch Protein-Chips, die mit Proteinen (Antikörpern, Peptiden, Rezeptoren) oder synthetischen Polypeptiden ausgestattet sind. Beim Drucken (Spotten) eines Microarrays werden die Fängermoleküle in einem geordneten, dicht gepackten Muster aufgebracht.



Dabei wird der Ort, an dem z.B. ein bestimmtes Oligonukleotid fixiert wird durch ein Koordinatensystem definiert.



**Abb. 2.24**

Die einzelnen Arbeitsschritte bei der Durchführung von Genexpressionsanalysen mit einem Oligonukleotid-Microarray.

Da die Fängermoleküle in der Lage sind ihre spezifischen Partner aus komplexen Lösungen herauszufinden, wird auf dem Microarray während der Analyse eine geeignete Pufferlösung, die markierte Partnermoleküle (z.B. markierte cDNA) enthält, gegeben. Die Menge der Zielmoleküle, die im Laufe einer mehrstündigen Hybridisierung an den Fängermolekülen (Sonden) gebunden werden, ist mit verschiedenen Detektionsmethoden

nachweisbar (Chemiluminiszenz, Radioaktivität, elektrochemische Verfahren, Massenspektroskopie). Am häufigsten wird jedoch die Markierung mit Fluorophoren angewendet und die Intensität der Fluoreszenz gemessen. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden Experimente mit DNA-Microarrays bzw. Oligonukleotid-Microarrays durchgeführt.

Die mit der DNA-Microarray-Analyse verbundenen hohen Kosten sind durch Vorteile, die diese Technologie gegenüber herkömmlichen Methoden der Genexpressionsanalyse (z.B. RT-PCR) bietet, gerechtfertigt. Zum einen liegen sie darin, die Expressionsniveaus vieler Gene in einem Experiment parallel bestimmen zu können, zum anderen in einem vergleichsweise niedrigen Probenverbrauch. So können aus einem Experiment Informationen über die Expression sogar mehrerer Tausend Gene gleichzeitig gewonnen werden und Microarrays sind prinzipiell für jede Analyse von biologischem Material einsetzbar. Typische Anwendungsbereiche sind jedoch Genexpressionsanalyse, Genotypisierung und SNP(single nucleotide polymorphism)-Analysen [Wilgenbus & Lichter, 1999; Klein-Hitpaß & Mörry, 2001].

Die Analyse der Genexpression mit Hilfe von Oligonukleotid-Microarrays enthält mehrere, definierte Arbeitsschritte (siehe Abb. 2.24), die in den folgenden Abschnitten dieser Arbeit näher erläutert werden.

#### 2.4.1 Entwicklung eines knorpelgewebespezifischen Oligonukleotid-Microarrays

Der erste Schritt beim Design eines Oligonukleotid-Microarrays ist die Auswahl der relevanten Gene und der entsprechenden mRNA-Sequenzen in einer Datenbank. Es wurden insgesamt 73 Gene gewählt, die in mehrere Untergruppen eingeteilt wurden (Tab. 2.5). Die Gruppe der Kontrollgene beinhaltete dabei diejenigen Gene, die vorwiegend in anderen Zelltypen exprimiert werden. Diese Zelltypen (z.B. Chondrozyten, Fibroblasten, hämatopoetische Stammzellen, Endothelialzellen) sind in einem aus Knorpelgewebe oder -mark isolierten Zellmaterial neben den osteogenen Zellen meist geringfügig vertreten.

**Tabelle 2.5**

#### Für das Design eines knorpelgewebespezifischen Oligonukleotid-Microarrays gewählte humane Gene

Nr.	Gennummer	Name des Gens in der NCBI-Datenbank	Benutzte Abkürzung
<b>Knorpelgewebespezifische Gene</b>			
<b>Transkriptionsfaktoren</b>			
1.	AF053952	CBFA1/OSF2 transcription factor	cbfa1/osf2
2.	AB022276	Cellular oncogene c-fos	c-fos*
3.	J04111	c-jun proto oncogene	c-jun
4.	L16785	c-myc transcription factor	c-myc
<b>Membranproteine</b>			
5.	XM_001826	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	ALP
6.	XM_043283	Cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)	Cadherin 11
7.	XM_027460	Gap junction protein, alpha 1, 43kDa (connexin 43)	Connexin 43*

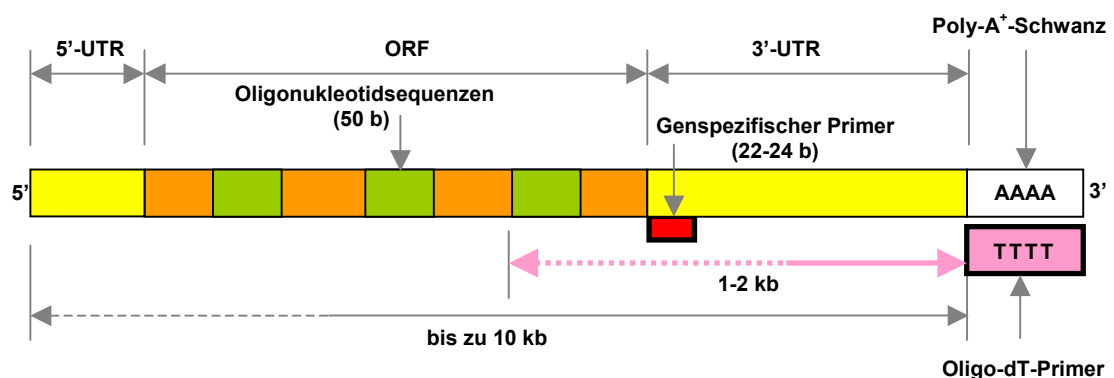
Nr.	Gennummer	Name des Gens in der NCBI-Datenbank	Benutzte Abkürzung
8.	XM_030326	CD44 antigen (CD44)	CD44
9.	NM_002203	Integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor) (ITGA2)	Integrin alpha 2*
10.	NM_002211	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 ) (ITGB1)	Integrin beta 1
11.	AF127670	Hyaluronic acid receptor (HAR)	Hyal-acid-rec
12.	U17418	Human parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor	PTH-PTHpep-rec
<b>ECM-Proteine</b>			
13.	XM_042153	Biglycan (BGN)	Biglycan
14.	XM_032432	Integrin-binding sialoprotein (bone sialoprotein, bone sialoprotein II) (IBSP)	BSP-II
15.	XM_037912	Collagen, type I, alpha 1 (COL1A1),	Collagen I-A1
16.	XM_029248	Collagen, type I, alpha 2 (COL1A2),	Collagen I-A2
17.	XM_016253	Collagen, type V, alpha 1	Collagen V-A1
18.	XM_012239	Decorin (DCN)	Decorin
19.	XM_001782	Fibromodulin (FMOD)	Fibromodulin
20.	BT006856	Fibronectin 1	Fibronectin 1*
21.	XM_006585	Matrix Gla protein (MGP)	Matrix Gla protein
22.	XM_002069	Bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein (osteocalcin) (BGLAP)	Osteocalcin
23.	XM_032759	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin) (SPARC)	Osteonectin
24.	XM_032431	Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I) (SPP1),	Osteopontin
<b>Wachstums-, Differenzierungsfaktoren und ihre Rezeptoren</b>			
25.	NM_002006	Fibroblast growth factor 2 (basic) (FGF2)	FGF-2*
26.	M34641	Fibroblast growth factor (FGF) receptor-1	FGF-recI*
27.	NM_22975	Fibroblast growth factor (FGF) receptor-2	FGF-recII*
28.	NM_001963	Epidermal growth factor (beta-urogastrone) (EGF)	EGF*
29.	NM_005228	Epidermal growth factor receptor (EGFR)	EGF-rec*
30.	XM_009629	Bone morphogenetic protein 2 (BMP2)	BMP-2
31.	XM_042360	Bone morphogenetic protein 3 (osteogenic) (BMP3)	BMP-3
32.	XM_004361	Bone morphogenetic protein 5 (BMP5)	BMP-5
33.	XM_037854	Bone morphogenetic protein 6 (BMP6)	BMP-6
34.	XM_012943	Bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1) (BMP7)	BMP-7
35.	XM_015818	Bone morphogenetic protein receptor, type IA (BMPRI A)	BMP-recIA
36.	XM_042907	Bone morphogenetic protein receptor, type IB (BMPRI B)	BMP-recIB
37.	XM_028038	Bone morphogenetic protein receptor, type II (BMPRII)	BMP-recII
38.	XM_052648	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C) (IGF1)	IGF-1
39.	XM_031026	Insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R)	IGF-1-rec
40.	XM_006402	Insulin-like growth factor 2 (somatomedin A) (IGF2)	IGF-2
41.	XM_004237	Insulin-like growth factor 2 receptor (IGF2R)	IGF-2-rec
42.	XM_031221	Interleukin 1, alpha (IL1A)	IL-1alpha
43.	XM_031218	Interleukin 1, beta (IL1B)	IL-1beta
44.	XM_038734	Interleukin 1 receptor, type I (IL1R1)	IL-1-recI
45.	XM_038742	Interleukin 1 receptor, type II (IL1R2)	IL-1-recII
46.	XM_033638	Interleukin 6 (interferon, beta 2) (IL6)	IL-6
47.	XM_036931	Interleukin 6 receptor (IL6R)	IL-6-rec
48.	X03795	Platelet derived growth factor A-chain (PDGF-A)	PDGF-A
49.	X02811	Platelet-derived growth factor B chain (PDGF-B)	PDGF-B
50.	XM_032213	Platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide (PDGFRA)	PDGF-rec-alpha-polypep
51.	XM_015815	Platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide (PDGFRB)	PDGF-rec-beta-polypep
52.	XM_030906	Transforming growth factor, beta 1 (TGFB1)	TGF-beta1
53.	XM_001754	Transforming growth factor, beta 2 (TGFB2)	TGF-beta2
54.	XM_007417	Transforming growth factor, beta 3 (TGFB3)	TGF-beta3

Nr.	Gennummer	Name des Gens in der NCBI-Datenbank	Benutzte Abkürzung
55.	XM_005591	Transforming growth factor, beta receptor I (activin A receptor type II-like kinase, 53 kDa) (TGFB1)	TGF-beta-rcI
56.	XM_003094	Transforming growth factor, beta receptor II (70-80 kDa)(TGFB2)	TGF-beta-rcII
57.	XM_001924	Transforming growth factor, beta receptor III (betaglycan, 300 kDa)(TGFB3)	TGF-beta-rcIII
58.	NM_003376	Vascular endothelial growth factor (VEGF)	VEGF*
<b>Kontrollgene</b>			
59.	XM_050153	Collagen, type II, alpha 1 (COL2A1)	Collagen II-A1
60.	NM_006982	Cartilage paired-class homeoprotein 1 (CART1)	Cart1
61.	XM_018467	Collagen, type X, alpha 1 (COL10A1)	Collagen X-A1
62.	XM_036615	CD34 antigen (CD34)	CD34
63.	Y00638	Leukocyte common antigen (T200, CD45)	T200
64.	XM_005096	Fatty acid binding protein 4, adipocyte (FABP4)	FABP4
65.	NM_001146	Angiopoietin 1 (ANGPT1)	Angiopoietin 1*
66.	NM_000442	Platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen) (PECAM1)	CD31*
67..	NM_000552	Willebrand factor (VWF)	VWF*
68.	AF063657	Vascular endothelial growth factor receptor (FLT1)	FLT1*
69.	NM_033294	Caspase 1, apoptosis-related cysteine protease (interleukin 1, beta, convertase) (CASP1)	Caspase 1*
70.	MWG Biotech AG	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	GAPDH *
71.	MWG Biotech AG	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase	HPRT *
72.	MWG Biotech AG	Pflanzliches Gen aus Arabidopsis thaliana	Arabidopsis a48*
73.	MWG Biotech AG	Pflanzliches Gen aus Arabidopsis thaliana	Arabidopsis b73*

\* - die mRNA-Sequenzen wurden von der Firma MWG Biotech AG ausgesucht.

\* - die Gene sind nur auf den von der Firma MWG Biotech AG hergestellten Arrays vertreten.

Die für die Definition der genspezifischen Oligonukleotide benötigten mRNA-Sequenzen wurden aus der NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA)-Datenbank ausgesucht. Die mRNA-Sequenzen der konstant exprimierten Housekeeping-Gene GAPDH und HPRT sowie zweier pflanzlicher Gene aus Arabidopsis thaliana wurden für den Entwurf der Positiv- und Negativkontrollen eingesetzt.



**Abb. 2.25**

**Aufbau einer funktionell aktiven mRNA und die Positionierung der Oligonukleotidsequenzen und der Sequenz eines genspezifischen reversen Primers.** UTR - nicht kodierende Bereiche der mRNA (untranslated region), ORF - kodierender Bereich der mRNA (open reading frame).

Bei der Definition geeigneter Oligonukleotide (meist 3 Sequenzen pro mRNA eines Gens) soll eine Reihe von Voraussetzungen erfüllt werden. Abbildung 2.25 zeigt das Grundprinzip der Positionierung der Sequenzen der drei Oligonukleotide und des genspezifischen Primers

innerhalb der Sequenz einer funktionell aktiven mRNA. Ferner müssen die Oligonukleotide ebenso wie die Primer (1) einen möglichst identischen GC-Gehalt (55-60 %) und (2) eine statistische Basenverteilung aufweisen, (3) dürfen keine „Stretches“, (4) keine selbstkomplementären Bereiche, d.h. keine Sekundärstrukturen besitzen und (5), was besonders wichtig ist, ihre Sequenz darf nur einmal im menschlichen Genom vorkommen. Auf Grund der letztgenannten Voraussetzung wird die Spezifität der Oligonukleotide auch von ihrer Länge bestimmt. Sequenzen, die von 40-50 Nukleotiden gebildet werden, scheinen für eine spezifische Detektion der cDNA am besten geeignet [Donner et al., 2001]. Ferner ist zu empfehlen bei der cDNA-Synthese neben einem Oligo-dT-Primer auch genspezifische Primer zu verwenden, damit der kodierende Bereich, in dem die Oligonukleotidsequenzen platziert werden, vollständig umgeschrieben wird. Gewöhnliche Reverse Transkriptasen (z.B. AMV-RT, M-MLV-RT) können einen mRNA-Bereich, der meistens nur ca. 1-2 kb umfasst, transkribieren [Mühlhardt, 2000].

Definition und Synthese genspezifischer Oligonukleotide und genspezifischer Primer wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) durchgeführt. Bei der Synthese wurde jedes Oligonukleotid mit einer Aminogruppe versehen, welche die spätere Bindung der Oligonukleotide an eine modifizierte Glasoberfläche beim Herstellen des Microarrays gewährleistet.

#### 2.4.2 Für die Microarray-Analyse benötigte Reagenzien und Lösungen

<u>Anti-FL-HRP-Lösung</u> (Bedarf pro Microarray):	Zur Herstellung werden 4 µl Anti-FL-HRP (gebrauchsfertig im Micromax™ TSA™ Labeling and Detection Kit enthalten) mit 300 µl des TNB-G-Blocking-Puffers versetzt. Die Lösung wird immer frisch vorbereitet.
<u>Anti-FL-HRP/Streptavidin-HRP-Puffer:</u>	Zur Herstellung werden 22,9 µl des Anti-FL-HRP und 22,9 µl des Streptavidin-HRP (beide gebrauchsfertig im Micromax™ TSA™ Labeling and Detection Kit enthalten) mit 4 ml des TNB-G-Blocking-Puffers versetzt. Der Puffer wird immer frisch vorbereitet.
<u>Blockierungsreagenz:</u>	Enthält BSA, Natriumdodecylsulfat (SDS) und NaCl/Natriumcitrat-Puffer (SSC-Puffer). Zur Vorbereitung werden 5 g BSA (Sigma), 25 ml 10 % SDS (Sigma) und 150 ml des 20fach konzentrierten SSC-Puffers (Sigma) in 500 ml MilliQ-Wasser gelöst. Das Reagenz wird immer frisch angesetzt.
<u>Chloroform:</u>	Gebrauchsfertig (Sigma). Wird ausschließlich für die RNA-Extraktion benutzt und bei Raumtemperatur aufbewahrt.
<u>4CN-Plus-Working-Solution</u> (HRP-Substrat):	Zur Herstellung werden 0,5 ml des BB-Diluents (im Micromax™ TSA™ Labeling and Detection Kit erhalten) mit 9 ml MilliQ-Wasser versetzt. Dann werden zu der vorbereiteten Lösung 0,1 ml des 4CN-Plus-Reagenz (im Micromax™ TSA™ Labeling and Detection Kit erhalten) gegeben. Die Lösung wird kurz vor dem Gebrauch angesetzt.
<u>Cyanine 3-Tyramide-Lösung</u> (Verbrauch pro Microarray):	Zur Herstellung wird das im Micromax™ TSA™ Labeling and Detection Kit enthaltene Cyanin 3-Tyramid in 20 µl Dimethylsulfoxids (DMSO, Sigma) gelöst und unter Lichtausschluss bei 4 °C gelagert. 2,5 µl der vorbereiteten Lösung werden unmittelbar vor Gebrauch mit 250 µl des Verstärkungsreagenz (Amplification Diluent, gebrauchsfertig im Micromax™ TSA™ Labeling and Detection Kit enthalten) versetzt.
<u>Cyanine 5-Tyramide-Lösung</u> (Verbrauch pro Microarray):	Zur Herstellung wird das im Micromax™ TSA™ Labeling and Detection Kit enthaltene Cyanin 5-Tyramid in 20 µl DMSO gelöst und unter Lichtausschluss bei 4 °C gelagert. 2,5 µl der vorbereiteten Lösung werden unmittelbar vor Gebrauch mit 250 µl des Verstärkungsreagenz versetzt.

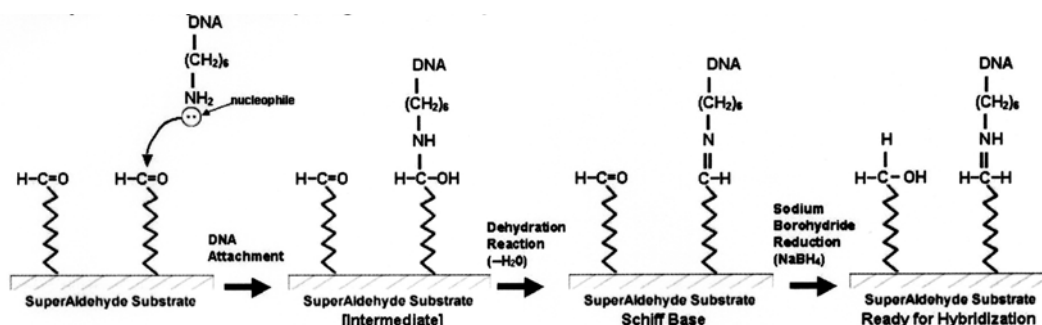
<u>DEPC-Wasser (RNase-, DNase-freies Wasser):</u>	Enthält 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC). Zur Vorbereitung wird 1 ml DEPC (Sigma) in 999 ml MilliQ-Wasser gegeben. Die Lösung wird kräftig geschüttelt, 12 h bei 37 °C aufbewahrt und danach 15 min bei 100 °C autoklaviert.
<u>EB-Puffer:</u>	Enthält 10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, pH=8,0. Gebrauchsfertig im QIAquick PCR purification Kit enthalten, wird bei Raumtemperatur gelagert.
<u>Einfach konzentrierter RT-Puffer:</u>	Zur Herstellung wird der 10fach konzentrierte RT-Puffer 1:9 mit eiskaltem, RNase- und DNase-freiem Wasser verdünnt. Die Lösung wird jedes Mal frisch angesetzt.
<u>EDTA 0,5 M:</u>	Gebrauchsfertig (Sigma), wird bei Raumtemperatur gelagert.
<u>Ethanol 75 %:</u>	Zur Herstellung werden 75 ml 100%igen Ethanols (J.T. Baker) mit 25 ml DEPC-Wasser versetzt, bei Raumtemperatur aufbewahrt und ausschließlich für die RNA-Extraktion benutzt.
<u>Gemisch genspezifischer Primer:</u>	Zur Herstellung werden in ein PCR-Gefäß 10 µl von jedem genspezifischen Primer (100 pmol/µl) pipettiert, das Volumen des Ansatzes bis zu 1 ml mit RNase-freiem Wasser ergänzt und vermischt. Das Gemisch wird aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Mehrfaches Auftauen und Einfrieren des Primer-Gemisches ist nicht zulässig.
<u>Guanidinhydrochlorid-Lösung 35 %:</u>	Zur Herstellung werden 35 g Guanidinhydrochlorid (Sigma) in 100 ml MilliQ-Wasser gelöst. Die Lösung wird bei Raumtemperatur gelagert.
<u>HRP-Inaktivierungslösung (Verbrauch pro Microarray):</u>	Enthält Natriumacetat. Zur Herstellung werden 10 µl des 3 M Natriumacetats mit 290 µl des HRP-Inaktivierungsreagenz (beide gebrauchsfertig im Micromax™ TSA™ Labeling and Detection Kit enthalten) versetzt. Die Lösung wird immer frisch vorbereitet.
<u>Hybridisierungspuffer A:</u>	Der gebrauchsfertige ArrayHyb™ LowTemp Hybridisation Buffer (Sigma), wird bei Raumtemperatur gelagert.
<u>Hybridisierungspuffer B:</u>	Der gebrauchsfertige Hybridisation Buffer (MWG-Biotech) wird aliquotiert und bei -20 °C gelagert.
<u>Isopropanol:</u>	Gebrauchsfertig (J.T. Baker). Wird ausschließlich für die RNA-Extraktion benutzt und bei Raumtemperatur aufbewahrt.
<u>Markiertes dCTP:</u>	Enthält mit Fluoreszein oder Biotin konjugiertes dCTP (1 mmol/l) in TE-Puffer. Gebrauchsfertig (PerkinElmer Life Sciences), wird bei 4 °C gelagert.
<u>NaBH<sub>4</sub>-Lösung:</u>	Enthält NaBH <sub>4</sub> , Ethanol und PBS. Zur Herstellung wird 1 g NaBH <sub>4</sub> (Sigma) in 300 ml PBS gelöst. Danach werden zu der Lösung 100 ml 100%igen Ethanols (J.T. Baker) hinzugefügt. Die Lösung wird immer frisch angesetzt.
<u>NaOH 1 N:</u>	Gebrauchsfertig (Merck), wird bei Raumtemperatur gelagert.
<u>Omniscript-RT:</u>	Gebrauchsfertig im Omniscript™ RT Kit (Qiagen) erhalten, wird bei -20 °C gelagert.
<u>PB-Puffer:</u>	Gebrauchsfertig im QIAquick PCR purification Kit (Qiagen) enthalten, wird bei Raumtemperatur gelagert.
<u>PE-Puffer:</u>	Zur Herstellung werden zu 6 ml des PE-Pufferkonzentrats (gebrauchsfertig im QIAquick PCR purification Kit erhalten) 24 ml 100%iges Ethanol (J.T. Baker) gegeben. Puffer wird bei Raumtemperatur gelagert.
<u>Reaktionsgemisch (Konzentrat):</u>	Enthält dATP, dCTP, dGTP, dTTP und den Oligo-(dT)-Primer. Gebrauchsfertig im Micromax™ TSA™ Labeling and Detection Kit (PerkinElmer Life Sciences) enthalten, wird bei 4 °C gelagert.
<u>RNase-, DNase-freies Wasser:</u>	Gebrauchsfertig im Omniscript™ RT Kit (Qiagen) enthalten, wird bei -20 °C gelagert.
<u>RNase-Inhibitor (10 Units/µl):</u>	Zur Herstellung wird der RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 Units/µl, Invitrogen) 1:4 mit eiskaltem, einfach konzentrierten RT-Puffer verdünnt. Die Lösung wird jedes Mal frisch angesetzt.

<u>RT-Puffer 10fach konzentriert:</u>	Gebrauchsfertig im Omniscript™ RT Kit (Qiagen) erhalten, wird bei -20 °C gelagert.
<u>RT-Puffer einfach konzentriert:</u>	Zur Herstellung wird der 10fach konzentrierte RT-Puffer 1:9 mit eiskaltem, RNase- und DNase-freiem Wasser verdünnt. Die Lösung wird jedes Mal frisch angesetzt.
<u>SDS 0,2 %:</u>	Enthält 0,2 % Natriumdodecylsulfat (SDS). Zur Herstellung wird die gebrauchsfertige 10 % SDS-Lösung (Sigma) 50fach mit MilliQ-Wasser verdünnt. Die vorbereitete Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt.
<u>Spotting-Buffer für CreativeChip® Oligo Slides (Eppendorf):</u>	Spotting Buffer (2x) (Eppendorf) ist gebrauchsfertig und wird bei Raumtemperatur gelagert.
<u>Spotting-Buffer für Silylated Slides CSS-100 (TeleChem International):</u>	ArrayIt Micro Spotting Plus Buffer (2x) (TeleChem International) ist gebrauchsfertig und wird bei Raumtemperatur gelagert.
<u>SSC-Puffer 2fach konzentriert:</u>	Enthält NaCl und Natriumcitrat. Zur Herstellung wird der gebrauchsfertige 20fach konzentrierte SSC-Puffer (Sigma) 1:10 mit MilliQ-Wasser verdünnt und bei Raumtemperatur gelagert.
<u>Streptavidin-HRP-Lösung (Verbrauch pro Microarray):</u>	Zur Herstellung werden 4 µl Streptavidin-HRP (gebrauchsfertig im Micromax™ TSA™ Labeling and Detection Kit enthalten) mit 300 µl TNB-G-Blocking-Puffer versetzt. Die Lösung wird immer frisch vorbereitet.
<u>Tris-HCl 1 M:</u>	Gebrauchsfertig (Invitrogen), wird bei 4 °C gelagert.
<u>TRIzol® Reagenz:</u>	Enthält Guanidinisothiocyanat und Phenol. Gebrauchsfertig (Invitrogen), wird bei 4 °C gelagert und vor der Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt.
<u>TE-Puffer:</u>	Enthält 10 mmol/l Tris-HCl und 1 mmol/l EDTA, pH=7,5. Zur Herstellung werden 1 ml 1 M Tris-HCl, pH=7,5 (Invitrogen) und 0,2 ml 0,5 M EDTA (Sigma) mit 98,8 ml DEPC-Wasser versetzt.
<u>TN-Puffer:</u>	Enthält 0,1 mol/l Tris-HCl und 0,15 mol/l NaCl. Zur Herstellung werden 100 ml 1 M Tris-HCl, pH=7,5 (Invitrogen) und 30 ml 5 M NaCl (Sigma) mit 870 ml MilliQ-Wasser versetzt. Puffer wird bei 4 °C gelagert.
<u>TNB-Puffer:</u>	Zur Herstellung werden 0,5 g des Blocking-Reagenz (im Micromax™ TSA™ Labeling and Detection Kit (PerkinElmer Life Sciences) enthalten) zu 100 ml des TN-Puffers gegeben und unter kontinuierlichem Rühren auf 60 °C erhitzt. Sobald das Blocking-Reagenz vollständig gelöst ist, wird der Puffer auf Raumtemperatur abgekühlt, aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.
<u>TNB-G-Blocking-Puffer:</u>	Zur Herstellung werden 4,5 ml TNB-Puffer mit 0,5 ml Ziegen Serum (Invitrogen) vermischt. Der Puffer wird immer frisch angesetzt.
<u>TNT-Puffer:</u>	Enthält 0,1 mol/l Tris-HCl, 0,15 mol/l NaCl und 0,05 % Tween-20. Zur Herstellung werden 100 ml 1 M Tris-HCl, pH=7,5 (Invitrogen), 30 ml 5 M NaCl (Sigma) und 0,5 g Tween-20 (Sigma) mit 870 ml MilliQ-Wasser versetzt. Der Puffer wird bei 4 °C gelagert.
<u>Waschpuffer 1:</u>	Enthält 0,5fach konzentrierten SSC-Puffer und 0,01 % SDS. Zur Herstellung werden 50 ml des 20fach konzentrierten SSC-Puffers (Sigma) und 2 ml 10%iges SDS (Sigma) mit 1948 ml MilliQ-Wasser versetzt. Der Puffer wird bei Raumtemperatur gelagert.
<u>Waschpuffer 2:</u>	Enthält 0,06fach konzentrierten SSC-Puffer und 0,01 % SDS. Zur Herstellung werden 6 ml des 20fach konzentrierten SSC-Puffers und 2 ml 10%iges SDS mit 1992 ml MilliQ-Wasser versetzt. Der Puffer wird bei Raumtemperatur gelagert.
<u>Waschpuffer 3:</u>	Enthält 0,06fach konzentrierten SSC-Puffer. Zur Herstellung werden 6,0 ml des 20fach konzentrierten SSC-Puffers mit 1994 ml MilliQ-Wasser versetzt. Der Puffer wird bei Raumtemperatur gelagert.

### 2.4.3 Herstellung der Oligonukleotid-Microarrays

Für die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Microarray-Experimente wurden sowohl selbst hergestellte als auch von der Firma MWG Biotech AG gespottete Microarrays verwendet. Bei der Herstellung eigener Microarrays wurden die von MWG Biotech AG gelieferten aminomodifizierten, aus 50 Basen ausgebildeten Oligonukleotide (100 µmol/l) in einer 96-Loch-PCR-Platte (Eppendorf) 1:1 mit dem Arraylt Micro Spotting Plus Buffer (TeleChem International, Sunnyvale, USA) oder Spotting-Puffer (Eppendorf) versetzt und gründlich vermischt. Danach wurde jedes Oligonukleotid dreimal mit dem GMS 417 Arrayer (Genetic MicroSystems, Woburn, USA) auf die mit Aldehydgruppen beschichteten Objektträger der Firma TeleChem International (Silylated Slides CSS-100) oder Objektträger der Firma Eppendorf (CreativeChip® Oligo Slides) gespottet.

Die gespotteten Microarrays wurden in ein Färbegestell (Omnilab, Bremen) platziert, 3 min mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt (Ultraviolettstrahler, Konrad Benda Laborgeräte, Wiesloch) und dann 2 h bei 80 °C (Silylated Slides CSS-100) oder 30 min bei 60 °C (CreativeChip® Oligo Slides) getrocknet. Die CreativeChip® Oligo Slides wurden anschließend in eine gut abgedichtete Objektträger-Box gestellt, bis zur Verwendung bei 4 °C dunkel und trocken gelagert und direkt vor der Hybridisierung gemäß der Herstellervorschrift weiter behandelt (siehe CreativeChip® Oligo Slides and CreativeChip® PCR Slides, Instruction Manual).



**Abb. 2.26**

**Schematische Darstellung der chemischen Bindung von aminomodifizierten Oligonukleotiden an eine mit Aldehydgruppen derivatisierte Glasoberfläche (CSS-100 Silylated Slides)** [übernommen aus Super Microarray Substrates Handbook, TeleChem International, 1999].

Die Silylated Slides CSS-100 wurden nach dem Trocknen noch ca. 24 h im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert. Am nächsten Tag wurde die Oberfläche der Microarrays zuerst reduziert und danach geblockt. Dadurch wurde eine stabile, kovalente Bindung der aminomodifizierten Oligonukleotide an die mit Aldehydgruppen derivatisierte Glasoberfläche erreicht und offene, nicht spezifische Bindungsstellen eliminiert (Abb. 2.26). Beim Reduzieren und Blocken der Oberfläche wurde das Färbegestell mit Arrays in einen dazu passenden Färbetrog (Omnilab) gestellt und dann die Microarrays:

- 2 min mit 0,2 % SDS gewaschen;
- zweimal 1 min mit MilliQ-Wasser gewaschen;



- 5 min mit NaBH<sub>4</sub>-Lösung gewaschen;
- 1 min mit eiskaltem MilliQ-Wasser gewaschen;
- 1 min mit 0,2 % SDS gewaschen;
- zweimal 1 min mit MilliQ-Wasser gewaschen;
- luftgetrocknet;
- 45 min im Wasserbad bei 42 °C mit Blocking-Reagenz inkubiert;
- fünfmal 2 min mit MilliQ-Wasser gewaschen.

Anschließend wurde jeder Microarray in ein 50 ml-Reaktionsgefäß platziert und zum Trocknen 3 min bei 1600 rpm zentrifugiert. Die für die Genexpressionsanalyse vorbereiteten Oligonukleotid-Microarrays wurden bis zur Verwendung in einer Objektträger-Box unter Lichtausschluss aufbewahrt.

#### 2.4.4 Isolierung der Gesamt-RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit TRIzol® Reagenz (Invitrogen). Diese Methode der RNA-Extraktion wird oft auch als „single-step RNA isolation“ bezeichnet [Chomczynski, 1993]. TRIzol® Reagenz enthält Guanidinisothiocyanat und Phenol. Das Erste lysiert die Zellen, denaturiert sowie inaktiviert die Proteine, einschließlich der RNasen; das Zweite entfernt die denaturierten Proteine und kleinere DNA-Fragmente. Nach der Zugabe von Chloroform und folgender Zentrifugation, bei der eine Phasentrennung stattfindet, bleibt die RNA im wässrigen Überstand zurück, aus dem sie anschließend mit Isopropanol gefällt wird. Proteine und DNA bleiben in der Interphase und unteren Phenol-Phase zurück.

Die für die Genexpressionsanalyse vorgesehenen Zellen wurden in T75-Flaschen kultiviert. Für die RNA-Extraktion wurde das Medium aus den Flaschen entfernt und die Zellschicht zweimal mit 5 ml PBS gewaschen. Danach wurden in jede Flasche 8 ml TRIzol® Reagenz pipettiert und die Flasche ca. 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der abgelöste Zellrasen wurde möglichst vollständig in ein steriles 50 ml-Reaktionsgefäß (Falcon™, Becton Dickinson) überführt und 45 s mit einem UltraTurrax® (T-25 basic, IKA Laborgeräte, Staufen) bei maximaler Drehzahl homogenisiert. Jeweils 1 ml des Homogenisats wurde auf 8 sterile 2 ml-Reaktionsgefäße (Eppendorf) verteilt und optional bis zu vier Wochen bei -70 °C eingefroren. Direkt im Anschluss (oder nach dem Auftauen des Homogenisats bei Raumtemperatur) wurden in jedes Reaktionsgefäß 200 µl Chloroform zugegeben. Die Gefäße wurden verschlossen, 15 s geschüttelt, 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und nachfolgend 15 min bei 4 °C und 12000 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5415 C, Eppendorf). 400 µl der oberen wässrigen Phase wurden vorsichtig entnommen und in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Für die RNA-Fällung wurden in jedes Reaktionsgefäß 500 µl Isopropanol zugegeben, die Proben leicht geschüttelt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und die gefällte Gesamt-RNA anschließend durch ein 10-minütiges Zentrifugieren bei 12000 rpm pelletiert. Der gewonnene Überstand wurde mit Hilfe einer Pipette vorsichtig

entfernt, das RNA-Pellet in 1 ml 75%igen Ethanol aufgenommen und die Proben 5 min bei 9500 rpm zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand mit Hilfe einer Pipette möglichst vollständig entfernt, das RNA-Pellet 5 min bei Raumtemperatur unter dem Abzug luftgetrocknet und dann in jedes Reaktionsgefäß 20 µl DEPC-Wasser zugegeben. Anschließend wurde die RNA in jedem Gefäß durch mehrfaches Pipettieren resuspendiert, in einem sterilen 1,5 ml-Reaktionsgefäß vereinigt und unverzüglich auf Eis gekühlt.

Die Reinheit und die Konzentration der isolierten Gesamt-RNA wurden spektralphotometrisch bestimmt. Dazu wurden 5 µl der frisch isolierten RNA mit 95 µl RNase-freiem Wasser (DEPC-Wasser) versetzt, gut vermischt und im Spektralphotometer (Smartspec 3000, Bio-Rad, München) die Absorption der Lösung bei 260 nm gegen einen Blindwert (DEPC-Wasser) bestimmt. Ein Absorptionswert von 1,0 entspricht dabei 40 µg/ml RNA (diese Relation gilt nur für RNA-Lösungen, die im Wasser aufbereitet werden), so dass eine einfache Berechnung der RNA-Konzentration in der vorliegenden Probe möglich ist.

**RNA-Konzentration (µg/ml) = 40 x  $A_{260}$  x VF**       $A_{260}$  = Absorption der RNA-Lösung bei 260nm;  
VF = Verdünnungsfaktor.

Das Verhältnis der Absorptionswerte, die bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm ermittelt werden ( $A_{260}/A_{280}$ ), erlaubt eine Aussage über die Reinheit der isolierten RNA. Da dieses stark vom pH-Wert abhängig ist, wurden bei der Reinheitsbestimmung 5 µl der gewonnenen RNA mit 95 µl TE-Puffer (pH=7,5) anstatt mit MilliQ-Wasser versetzt. Anschließend wurden die Absorptionswerte der Lösung im Spektralphotometer bei 260 nm und 280 nm gegen einen Blindwert (TE-Puffer) bestimmt. Eine sauber extrahierte RNA hat im TE-Puffer ein  $A_{260}/A_{280}$ -Verhältnis von 1,9 - 2,1. Niedrigere  $A_{260}/A_{280}$ -Werte weisen dabei auf eine Proteinkontamination hin. Nach der Konzentrations- und Reinheitsbestimmung wurde die isolierte RNA aliquotiert und bis zur Verwendung bei -70 °C aufbewahrt. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der RNA-Proben wurde grundsätzlich vermieden. Während der RNA-Extraktion wurden separate Reagenzien, Pipetten und Kunststoffmaterialien (Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen) verwendet, die RNase-frei waren und ausschließlich nur für diesen Zweck benutzt wurden.

#### 2.4.5 Synthese der markierten cDNA

Die Synthese einer markierten cDNA wurde mit dem Omniscript<sup>TM</sup> RT Kit (Qiagen, Hilden) und Micromax<sup>TM</sup> TSA<sup>TM</sup> Labeling and Detection Kit (PerkinElmer Life Sciences) durchgeführt. In diesem Arbeitsschritt wurde die in der Gesamt-RNA-Probe vorhandene mRNA in eine cDNA translatiert. Dabei wurde das mit Fluoreszein (FL) oder mit Biotin (BI) konjugierte dCTP (2'-Desoxy-Cytidintriphosphat) in die cDNA eingebaut. Dieser Vorgang ermöglichte in den nachfolgenden Arbeitsschritten die Markierung der auf dem Microarray gebundenen komplementären cDNA-Moleküle mit zwei unterschiedlichen Fluorophoren (Cy3 und Cy5) sowie die Verstärkung des Fluoreszenzsignals (siehe 2.4.8 und 2.4.9). Das im Micromax<sup>TM</sup>

TSA™ Labeling and Detection Kit vorhandene Signalverstärkungssystem (TSA™(Tyramide Signal Amplification)-System, siehe Abb. 2.29) erlaubte die anfänglich eingesetzte Menge der Gesamt-RNA auf 2 µg zu reduzieren. Dadurch konnte auch die Zahl der für die Gewinnung der Gesamt-RNA benötigten Zellen wesentlich verringert werden.

Für die cDNA-Synthese wurde nur solche Gesamt-RNA, die einen  $A_{260}/A_{280}$ -Wert über 1,80 aufwies, eingesetzt und separate Reagenzien, Pipetten und Kunststoffmaterialien (Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen), die RNase- und DNase-frei sind, verwendet.

Alle benötigten Reagenzien sowie RNA wurden nach dem Auftauen auf einem Vortex kurz gemischt und sofort auf Eis gekühlt. Für jeden Ansatz der cDNA-Synthese wurden in einem auf Eis vorgekühlten 0,5 ml-PCR-Gefäß (Eppendorf) 2 µg (variables Volumen) der Gesamt-RNA, 8 µl des Gemisches genspezifischer Primer, 1 µl des Reaktionsgemisches und 1 µl des mit Fluoreszein oder Biotin konjugierten dCTP pipettiert. Danach wurde das Volumen des Ansatzes auf 20 µl mit RNase-freiem Wasser ergänzt und gründlich vermischt. Das Gefäß mit dem Ansatz wurde in einen Thermocycler (Eppendorf Mastercycler personal, Eppendorf) gestellt und:

- 10 min bei 65 °C inkubiert (dadurch werden die Sekundärstrukturen der RNA aufgelöst);
- 5 min bei 25 °C gekühlt (in dieser Zeit legen sich die Primer an die mRNA an);
- 3 min auf 42 °C erwärmt.

Danach wurden zu dem Ansatz 2,5 µl des 10fach konzentrierten RT-Puffers, 1,25 µl des RNase-Inhibitors und 1,25 µl der Omniscript RT zugefügt. Der Reaktionsansatz wurde auf dem Vortex gut vermischt, danach weitere 90 min bei 42 °C inkubiert und anschließend 5 min bei 4 °C gekühlt. Um die Template-mRNA zu hydrolysieren, wurden zu dem Reaktionsansatz 2,5 µl 0,5 M EDTA (stoppt die Reaktion der cDNA-Synthese) und 2,5 µl 1N NaOH (initiiert die Hydrolyse) pipettiert. Nach jedem Pipettierschritt wurde der Ansatz gründlich gemischt. Im Anschluss daran wurde der Ansatz 30 min bei 65 °C inkubiert und 5 min bei 4 °C gekühlt. Zur Neutralisierung der Reaktion wurden in das PCR-Gefäß 6,61 µl 1 M Tris·HCl gegeben und der Ansatz gemischt.

#### **2.4.6 Aufreinigung der synthetisierten cDNA**

Die Aufreinigung der synthetisierten cDNA erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Das Prinzip der Aufreinigungsmethode basiert auf einer selektiven, pH-abhängigen Bindung der DNA an eine Säule mit Silica-Gel. Zuerst wird die cDNA in eine geeignete Pufferlösung mit niedrigem pH-Wert (< 7,5) und hoher Konzentration chaotroper Salze aufgenommen. Dann wird die DNA-haltige Pufferlösung auf die Säule pipettiert, wo die DNA an dem Silica-Gel bindet. Die Kontaminanten (z.B. nicht eingebaute Nukleotide, Primer, RT, RNA) passieren die Säule und werden verworfen. Anschließend wird die gebundene cDNA

mit einem ethanolhaltigen Puffer gewaschen und nachfolgend mit einem Tris-Puffer, dessen pH-Wert über 7,5 liegt, eluiert.

Zur Durchführung der Aufreinigung wurde eine Volumeneinheit der gewonnene cDNA mit 5 Volumeneinheiten des PB-Puffers versetzt, auf dem Vortex vermischt und auf eine QIAquick-Säule, die vorher in ein 2 ml-Reaktionsgefäß (im Kit vorhanden) platziert wurde, pipettiert. Anschließend wurde:

- das Reaktionsgefäß mit der Säule 1 min bei Raumtemperatur und 13000 rpm zentrifugiert;
- der Durchfluss entfernt, die Säule in das selbe Reaktionsgefäß zurückgestellt;
- 700 µl 35 % Guanidinhydrochlorid-Lösung auf die Säule gegeben und das Reaktionsgefäß mit der Säule 1 min bei Raumtemperatur und 13000 rpm zentrifugiert;
- der Durchfluss entfernt und die Säule in das selbe Reaktionsgefäß zurückgestellt;
- 750 µl PE-Puffer auf die Säule gegeben und das Reaktionsgefäß mit der Säule 1 min bei Raumtemperatur und 13000 rpm zentrifugiert;
- der Durchfluss entfernt und die Säule in das selbe Reaktionsgefäß zurückgestellt;
- das Reaktionsgefäß mit der Säule 1 min bei Raumtemperatur und 14000 rpm zentrifugiert;
- die Säule in ein neues, steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf) platziert;
- 30 µl des EB-Puffers direkt in das Zentrum der Säule gegeben und das Reaktionsgefäß mit der Säule nach 1 min Wartezeit 1 min bei Raumtemperatur und 13000 rpm zentrifugiert;
- die Säule entfernt und die eluierte cDNA auf Eis gekühlt.

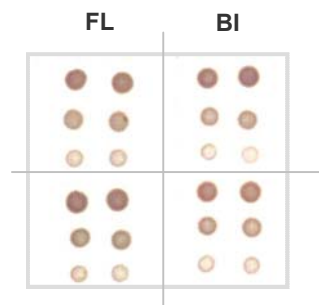
#### **2.4.7 Überprüfung der markierten cDNA**

Die Überprüfung der Effizienz der durchgeführten cDNA-Synthese erfolgte mit dem Micromax<sup>TM</sup> TSA<sup>TM</sup> Labeling and Detection Kit (PerkinElmer Life Sciences). Dazu wurde die aufgereinigte cDNA auf eine GeneScreen<sup>TM</sup>-Membran (enthalten im Kit) gespottet und mit UV-Licht immobilisiert. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden inaktiviert (geblockt) und das in die cDNA eingebaute, markierte dCTP mit einem Anti-Fluoreszein-Antikörper oder Streptavidin, welche ihrerseits mit einer HRP konjugiert sind, gekennzeichnet. Nach der Zugabe des HRP-Substrats färbten sich die cDNA-Bindungsstellen violett ein. Damit war eine semiquantitative Beurteilung der Effizienz der durchgeführten cDNA-Synthese möglich (Abb. 2.27).

Bei der Analyse wurde 1 µl von jeder aufgereinigten cDNA mit 9 µl des sterilen TE-Puffers versetzt. Aus dieser 1:10 Verdünnung wurden danach 1:20 und 1:40 Verdünnungen der cDNA in TE-Puffer erstellt. Anschließend wurden zweimal je 1 µl jeder Verdünnung mit

Hilfe einer 2,5 µl Mikroliterpipette auf die GeneScreen™-Membran gespottet. Die Membran wurde:

- unter der Clean Bench getrocknet;
- in einer Petrischale (Nunc) mit ca. 5 ml des zweifach konzentrierten SSC-Puffers beschichtet und 3 min mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt;
- in eine neue Petrischale gelegt, mit 5 ml TNB-G-Blocking-Puffer bedeckt und 30 min bei Raumtemperatur und 350 rpm auf einem Schüttler (KL-2, Edmund Bühler, Laborgerätebau, Hechingen) bewegt;
- in eine neue Petrischale gelegt, mit 4 ml des Anti-FL-HRP/Streptavidin-HRP-Puffers beschichtet und dann erneut 30 min bei Raumtemperatur und 350 rpm geschüttelt;
- in eine saubere Petrischale gelegt und viermal 5 min lang mit TNT-Puffer bei Raumtemperatur und 350 rpm gewaschen;
- in eine neue Petrischale gelegt, mit 5 ml 4CN-Plus-Working-Solution beschichtet und unter Lichtausschluss 30 min bei Raumtemperatur und 350 rpm geschüttelt;
- unter Lichtausschluss getrocknet.



**Abb. 2.27**

Visualisierte cDNA-Bindungsstellen auf einer GeneScreen™-Membran. Es wurden zwei mit Fluorescein (FL) und zwei mit Biotin (BI) markierte cDNAs überprüft. Auf der Membran sind alle drei Verdünnungen der vorliegenden cDNAs gut zu sehen.

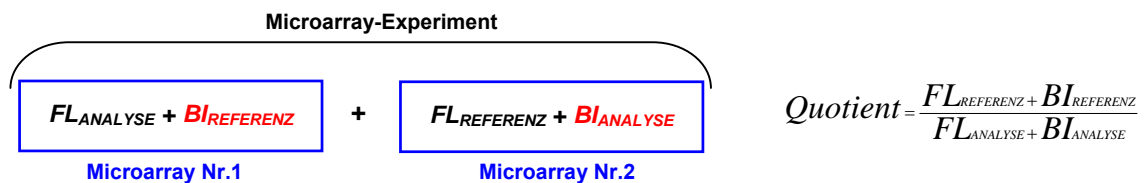
Auf die Microarrays wurden nur solche cDNA aufgebracht, bei denen auf der GeneScreen™-Membran die Bindungsstellen aller drei erstellten Verdünnungen gut zu sehen waren (Abb. 2.27).

#### 2.4.8 Hybridisierung der markierten cDNA auf dem Microarray

Die Analyse der Genexpression erfolgt meist als vergleichende oder subtraktive Analyse, bei der z.B. eine „behandelte“ Zellpopulation (Analyse) mit einer nativen Zellpopulation (Referenz) verglichen wird, um Unterschiede im Expressionsgrad der Gene zu bestimmen. Dieser Vergleich kann auch nach dem Prinzip der Kohybridisierung durchgeführt werden. Dazu wird die RNA aus beiden zu vergleichenden Zellpopulationen isoliert und die gleiche Menge an Gesamt-RNA für die cDNA-Synthese eingesetzt. Während der cDNA-Synthese werden aber die beiden cDNAs unterschiedlich markiert, z.B. mit den zwei Fluorophoren Cy3 (Indocarbocyanin) und Cy5 (Indodicarbocyanin), welche unterschiedliche Absorptions- und

Emissionsspektren aufweisen. Diese für die Detektion der Signale benötigte Fluoreszenzmarkierung kann auch, wie im konkreten Fall, in zwei Stufen erfolgen.

Nach der cDNA-Synthese werden die beiden unterschiedlich markierten cDNAs gemischt und auf dem Oligonukleotid-Microarray gleichzeitig aufgetragen, wo sie unter geeigneten Bedingungen an die fixierten komplementären Oligonukleotide binden, bzw. um die gleichen Oligonukleotide konkurrieren. Bei einer zweistufigen Markierung müssen die auf dem Microarray gebundenen cDNA-Moleküle dann noch in einem weiteren Arbeitsschritt mit zwei verschiedenen Fluorophoren konjugiert werden (siehe 2.4.9). Der Quotient der beiden anschließend gemessenen Fluoreszenzintensitäten pro fixiertes Oligonukleotid erlaubt eine semi-quantitative Bestimmung des Unterschiedes im Expressionsgrad des konkreten Gens.



**Abb. 2.28**

Schema eines Microarray-Experiments und das Grundprinzip der Berechnung von Quotienten der differentiellen Genexpression.  $FL_{REFERENZ}$  - mit Fluoreszein markierte Referenz-cDNA;  $FL_{ANALYSE}$  - mit Fluoreszein markierte Analysen-cDNA;  $BI_{REFERENZ}$  - mit Biotin markierte Referenz-cDNA;  $BI_{ANALYSE}$  - mit Biotin markierte Analysen-cDNA.

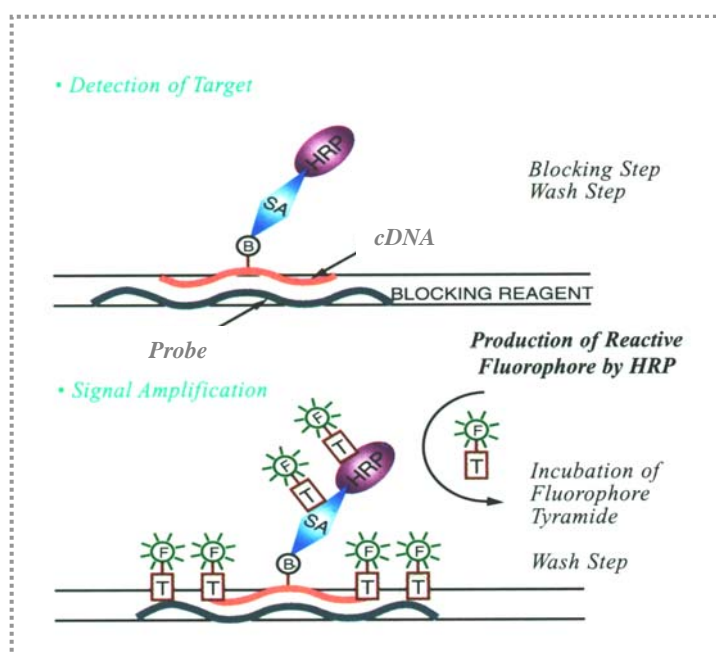
Um Differenzen in der Effizienz der cDNA-Markierung und Hybridisierung zu minimieren, wurden in jedem durchgeführten Microarray-Experiment zwei Arrays eingesetzt (Abb. 2.28). Bei dieser Gestaltung des Experiments wurden auf dem ersten Array eine mit Fluoreszein markierte Referenz-cDNA und eine mit Biotin markierte Analysen-cDNA hybridisiert, auf dem zweiten Array wurde die Markierung gewechselt, d.h. für die Hybridisierung wurde eine nun mit Biotin markierte Referenz-cDNA und eine mit Fluoreszein markierte Analysen-cDNA eingesetzt. Nach der Hybridisierung wurden die gebundenen cDNAs mit Cy3 oder Cy5 konjugiert und bei der Berechnung der Quotienten der differentiellen Genexpression die jeweiligen Signalintensitäten aus beiden Arrays berücksichtigt. (siehe auch 2.4.10).

Zur Hybridisierung der cDNA-Proben auf den Microarrays wurden die zwei zusammengehörigen aufgereinigten cDNA-Lösungen in einem sterilen 1,5 ml-Reaktionsgefäß vereint und 40 min bei 30 °C in einem Konzentrator vakuumgetrocknet (Concentrator 5361, Eppendorf). Bei selbst hergestellten Microarrays wurde das gewonnene Pellet in 17 µl des auf 42 °C vorgewärmten Hybridisierungspuffers A, bei MWG-Arrays in 100 µl des vorgewärmten Hybridisierungspuffers B aufgenommen und mit Hilfe einer Pipette sorgfältig resuspendiert. Danach wurden die vereinten cDNAs im Thermomixer (Thermomixer 5436, Eppendorf) 5 min bei 95 °C denaturiert, die Probe kurz zentrifugiert, um Flüssigkeitsreste von den Gefäßrändern zu sammeln, 1 min auf Eis gekühlt und unverzüglich auf den gespotteten Bereich des Microarrays appliziert. Bei den selbst hergestellten

Microarrays wurde der Applikationsbereich luftblasenfrei mit einem Deckgläschen (Hybri-Slips, 22x22mm, Sigma) abgedeckt und die Microarrays 18 h in einer mit zweifach konzentriertem SSC-Puffer angefeuchteten Kammer bei 42 °C inkubiert. Bei MWG-Arrays wurde jede vereinte cDNA-Probe mit Hilfe eines Gene Frame® (small, MWG-Biotech) appliziert und die Microarrays in einem Thermomixer (Thermomixer comfort, Eppendorf) 18 h bei 42 °C und 450 rpm inkubiert.

#### 2.4.9 Signaldetektion und Scannen des Microarrays

Die Detektion der gebundenen komplementären cDNA-Moleküle wurde mit dem Micromax™ TSA™ Labeling and Detection Kit (PerkinElmer Life Sciences) durchgeführt. Zuerst wurde die auf dem Microarray nicht gebundene cDNA durch mehrere Waschschrte entfernt. Danach wurden die nicht spezifischen Bindungsstellen auf der Oberfläche des Arrays geblockt und der Microarray mit dem HRP-konjugierten Anti-Fluoreszein-Antikörper (Anti-FL-HRP) inkubiert. Dabei dockte der Anti-FL-HRP an die auf dem Microarray hybridisierte cDNA an, die vorher mit Fluoreszein markiert wurde. Nach Entfernen der überschüssigen Antikörper durch einen Waschschrte wurde der Microarray mit Cyanin 3(Cy3)-Tyramid-Lösung überschichtet. Die immobilisierte HRP katalysierte die Anlagerung zahlreicher mit Cy3 markierter Tyramidmoleküle in ihrer direkten Nähe und bewirkte dadurch eine Verstärkung des Fluoreszenzsignals (Abb. 2.29).



**Abb. 2.29**  
**Schematische Darstellung des Prinzips der durch Tyramid vermittelten Signalverstärkung am Beispiel von mit Biotin markierter cDNA (übernommen aus PerkinElmer Life Sciences, Inc. Produktkatalog 2000/2001).**

**B - Biotin;**  
**SA - Streptavidin;**  
**F - Fluorophor;**  
**T - Tyramid;**  
**HRP – Meerrettichperoxidase.**

Im nächsten Schritt wurde die Cy3-Tyramid-Lösung durch Waschen entfernt, die HRP inaktiviert und anschließend der Microarray mit Streptavidin, welches ebenfalls mit HRP konjugiert war (Streptavidin-HRP), inkubiert. Streptavidin dockte an die auf dem Microarray hybridisierte cDNA an, die zuvor mit Biotin markiert wurde. Danach wurde das überschüssige Streptavidin-HRP-Konjugat durch einen Waschgang entfernt und der Microarray mit der

Cyanin 5(Cy5)-Tyramid-Lösung überschichtet. Jetzt katalysierte die HRP die Anlagerung mit Cy5 markierter Tyramidmoleküle. Anschließend wurde der Microarray erneut gewaschen, getrocknet und in einem Array Scanner gescannt.

Bei der praktischen Durchführung der Signaldetektion wurde von der Oberfläche des Microarrays oder des Gene Frame® zuerst, ohne den Applikationsbereich zu berühren, das Deckgläschen entfernt. Dann wurden die Microarrays in eine Glas-Petrischale (Omnilab) gelegt und:

- 5 min in Waschpuffer 1 gewaschen;
- 5 min in Waschpuffer 2 gewaschen;
- 2 min in Waschpuffer 3 gewaschen.

Um den Applikationsbereich wurde bei selbst hergestellten Microarrays anschließend ein Rahmen mit dem ImmEdge™-Pen (Vector Laboratories, Burlingame, USA) gezogen. Dadurch wurde eine hydrophobe Barriere auf der Oberfläche des Arrays ausgebildet. Bei den MWG-Arrays wurde der Applikationsbereich durch Gene Frame®, der nach der Hybridisierung nicht entfernt wurde, abgegrenzt. Danach wurde:

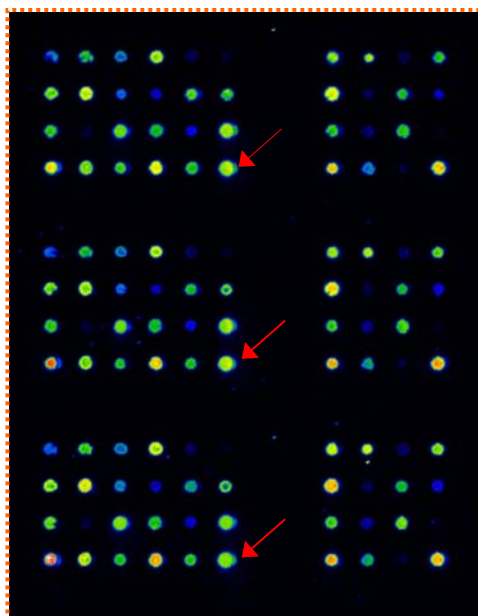
- der Applikationsbereich 10 min mit 300 µl TNB-G-Blocking-Puffer behandelt;
- der Array dreimal 1 min in TNT-Puffer gewaschen;
- der Applikationsbereich 10 min mit 300 µl Anti-FL-HRP-Lösung behandelt;
- der Array dreimal 1 min in TNT-Puffer gewaschen;
- der Applikationsbereich 10 min mit 250 µl Cy3-Tyramid-Lösung behandelt;
- der Array dreimal 5 min in TNT-Puffer gewaschen;
- der Applikationsbereich 10 min mit 300 µl der HRP-Inaktivierungslösung behandelt;
- der Array dreimal 1 min in TNT-Puffer gewaschen;
- der Applikationsbereich 10 min mit 300 µl Streptavidin-HRP-Lösung behandelt;
- der Array dreimal 1 min in TNT-Puffer gewaschen;
- der Applikationsbereich 10 min mit 250 µl Cy5-Tyramid-Lösung behandelt;
- der Array dreimal 5 min in TNT-Puffer gewaschen;
- der Array 1 min in Waschpuffer 3 gewaschen;
- der Array in ein steriles 50 ml-Röhrchen platziert und zum Trocknen 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5403, Eppendorf).

Alle Arbeitsschritte der Signaldetektion wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Waschen der Microarrays erfolgte in Glas-Petrischalen auf einem Schüttler (KL-2) bei 350 rpm.

Anschließend wurden die Signalintensitäten mittels eines konfokalen Laserscanners (GMS 418 Array Scanner, Affymetrix, Santa Clara, USA) detektiert (Abb. 2.30). Beide auf dem Microarray gebundenen Cyanin-Fluoreszenzfarbstoffe wurden gemäß ihrem Absorptionsmaximum angeregt (Cy3 mit einem grünen Laser, Cy5 mit einem roten Laser) und das Fluoreszenzsignal bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen (Cy3 bei 532 nm,



Cy5 bei 635 nm) und drei verschiedenen Intensitäten der Anregung und Signalverstärkung (50/20, 70/30, 90/40) gemessen.



**Abb. 2.30**

Ausschnitt einer Bilddatei, die beim Scannen eines selbst hergestellten Oligonukleotid-Microarrays im Cy3-Farbkanal gewonnen wurde. Die Oligonukleotide sind auf einem Objektträger der Firma Eppendorf (CreativeChip® Oligo Slides) aufgebracht.

Auf dem Bild sind die drei Bindungsstellen jedes Oligonukleotids (bezeichnet durch rote Pfeile) gut zu erkennen.

#### 2.4.10 Mathematische Auswertung der Daten aus den Microarray-Experimenten

Die quantitative Auswertung der Bilddateien, d.h. die Ermittlung der Signalintensitäten, erfolgte mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImaGene 4.1 (BioDiscovery, El Segundo, USA). Die gewonnenen Rohdaten wurden anschließend mit Microsoft Excel verarbeitet.

**Tabelle 2.6**

#### Schema der Datenbearbeitung und Berechnung von Quotienten der differentiellen Genexpression in einem Microarray-Experiment

Analyse								
Gene	Microarray 1				Microarray 2			
	Cy3-Fluoreszenzkanal				Cy5-Fluoreszenzkanal			
	Scanparameter				Scanparameter			
	50/20	70/30	90/40	Σ	50/20	70/30	90/40	Σ
Gen 1	10*	20*	40*	70	6*	14*	30*	50
Gen 2								
Gen 70								
Gen 71	4*	8*	18*	30	7*	14*	29*	50
Gesamtintensität	7500				5000			
Referenz								
Gene	Microarray 1				Microarray 2			
	Cy5-Fluoreszenzkanal				Cy3-Fluoreszenzkanal			
	Scanparameter				Scanparameter			
	50/20	70/30	90/40	Σ	50/20	70/30	90/40	Σ
Gen 1	15*	30*	60*	105	23*	47*	95*	165
Gen 2								
Gen 70								
Gen 71	20*	40*	80*	140	12*	28*	60*	100
Gesamtintensität	5500				8000			

\* - Die Werte stellen eine Summe von 9 oder 6 Signalintensitäten dar, die von allen drei Nukleotiden des Gens geliefert werden. Jedes von ihnen wurde dreimal (bei selbst hergestellten Arrays) oder zweimal (bei von MWG-Biotech hergestellten Arrays) auf den Microarray aufgebracht.

\* - Bei einem Quotient = 1,0 ist die Expression des Gens unverändert. Bei Quotienten, die über 1,0 liegen ist die Expression des Gens höher, bei Quotienten unter 1,0 - niedriger.

Zur Verdeutlichung einer niedrigeren Genexpression wurden die Quotienten unter 1,0 als negativer Kehrwert dargestellt.

$$\text{Quotient}_{\text{Gen1}} = (70:7500 + 50:5000) : (105:5500 + 165:8000) = 0,1033 : 0,0397 = 2,6020$$

$$\text{Quotient}_{\text{Gen71}} = (30:7500 + 50:5000) : (140:5500 + 100:8000) = 0,005 : 0,0379 = 0,1319 \text{ (bzw. } -7,58^*)$$

Da bereits geringe Abweichungen in der Durchführung der Hybridisierung, in der Qualität der hergestellten Arrays, der cDNA-Proben und in der Menge der aufgetragenen Fluoreszenzfarbstoffe die Signalintensitäten spürbar beeinflussen können [Schuchhardt et al., 2000], wurde jeder aus einem Array ermittelte Signalwert zuerst mit dem lokalen Hintergrund korrigiert und danach auf die gesamte Signalstärke des jeweiligen Fluoreszenzkanals normalisiert. Anschließend wurden die Quotienten der differentiellen Genexpression berechnet (siehe 2.4.8). Das prinzipielle Muster der Datenbearbeitung und ein schematisches Beispiel der Berechnungen von Quotienten sind in der Tabelle 2.6 dargestellt.

#### 2.4.11 Reproduzierbarkeit der Microarray-Experimente

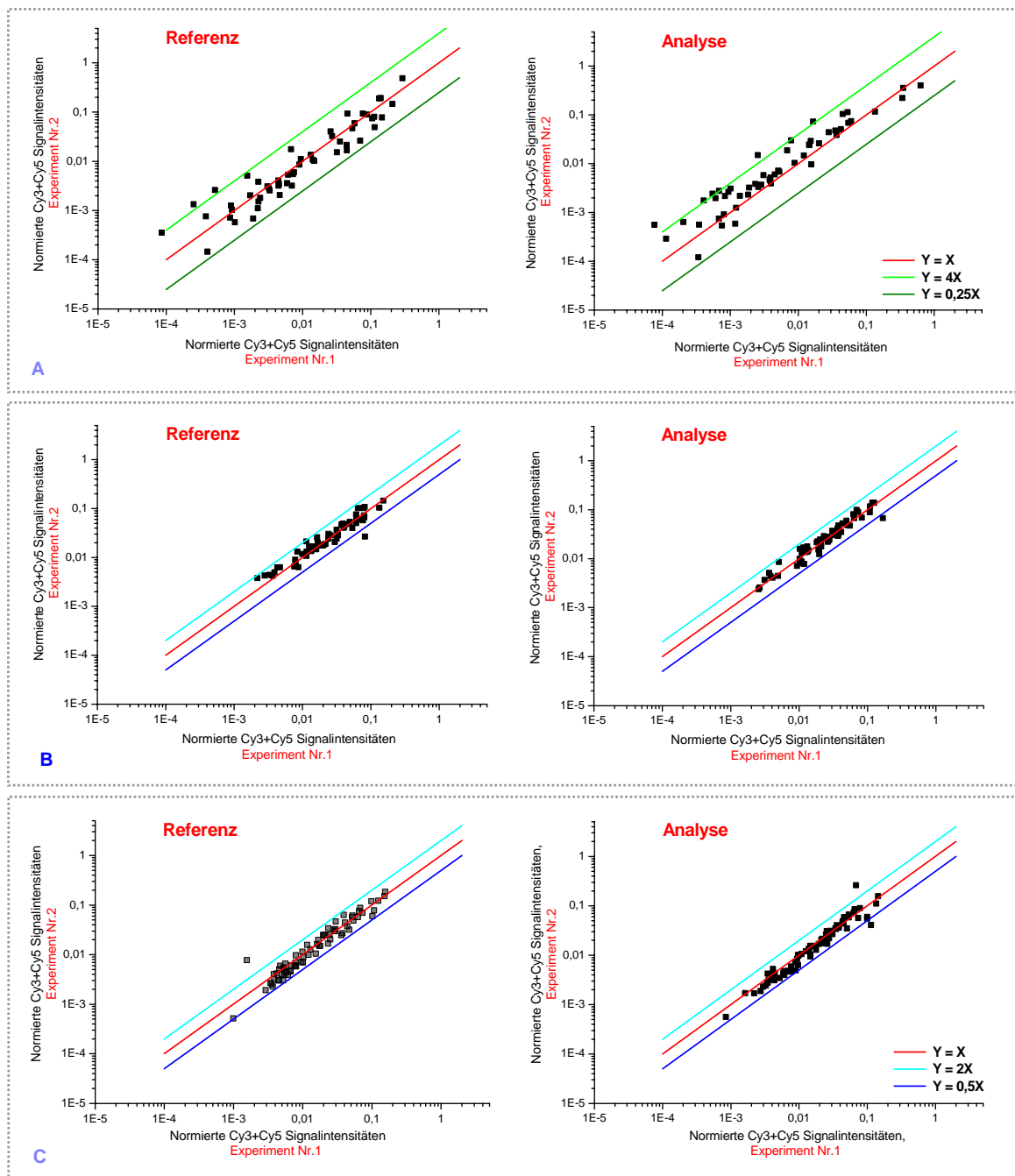
Bei der Ermittlung der differentiellen Genexpression wurde für jedes Gen aus zwei identischen Microarray-Experimenten (also aus insgesamt 4 Arrays) ein Quotienten-Mittelwert berechnet.

In diesem Zusammenhang war es wichtig die Reproduzierbarkeit der durchgeführten Experimente zu bestimmen. Abbildung 2.31 zeigt die Ergebnisse von drei der durchgeführten Kontrolluntersuchungen. Bei der Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurden die Summen der normierten Fluoreszenzintensitäten (siehe 2.4.10), die von denselben Referenzen und denselben Analysen in jeweils zwei Experimenten ermittelt wurden, graphisch gegeneinander aufgetragen. Bei einer bestmöglichen Reproduzierbarkeit müssten die Datenpunkte auf der Geraden (rote Linie), die durch den Nullpunkt mit einer Steigung von 1,0 gezogen wird, liegen und die Quotienten der differentiellen Genexpression bei allen untersuchten Genen dem Wert 1,0 entsprechen.

In der Abbildung 2.31 ist eindeutig zu sehen, dass Versuche unter Verwendung von Microarrays auf Basis von Objektträgern der Firma Eppendorf (CreativeChip® Oligo Slides) oder epoxybeschichteten Objektträgern der Firma MWG Biotech die beste Reproduzierbarkeit zeigten. Bei diesen Arrays befanden sich 97,2-98,6 % aller normierten Signalintensitäten in dem mit blauen Geraden eingegrenzten Bereich, der den Quotienten -2,0 bis 2,0 entsprach. Das bedeutet, dass in den dargestellten Experimenten nur Quotienten, die größer als 2,0 oder kleiner als -2,0 (d.h. kleiner als 0,5) sind, als statistisch relevant angesehen werden können.

Beim Einsatz der Microarrays, die auf den Objektträgern der Firma TeleChem International (Silylated Slides CSS-100) hergestellt wurden, war die gleiche Reproduzierbarkeit meist nur bei einem erweiterten Signifikanzbereich gewährleistet (grüne Geraden). Im konkreten Fall entsprach dies dem Wert 4,0, d.h. nur Quotienten, die über einen Wert von 4,0 oder unter einem Wert von -4,0 (d.h. 0,25) lagen, konnten als relevant betrachtet werden. Um die Zuverlässigkeit und Qualität der gewonnenen Daten zu erhöhen, ist zu empfehlen, die Reproduzierbarkeit jedes einzelnen Microarray-Versuchs zu überprüfen. Bei Microarray-

Experimenten werden meist Quotienten von 2,0 bzw. -2,0 als Grenze der Reproduzierbarkeit angesehen [Brazma & Vilo, 2001].



**Abb. 2.31**

Ergebnisse von drei Kontrolluntersuchungen zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Microarray-Experimente. **A** - Arrays auf Basis von Silylated Slides CSS-100 (TeleChem International); **B** - Arrays auf Basis von CreativeChip® Oligo Slides (Eppendorf); **C** - Arrays auf Basis von epoxybeschichteten Slides (MWG Biotech). Die **rote Linie** markiert die theoretisch ideale Verteilung der Datenpunkte (Ratio=1), die **blauen Linien** grenzen den Bereich der Quotienten -2,0 bis 2,0, die **grünen Linien** den Bereich der Quotienten -4,0 bis 4,0 ein.

### **3 Ergebnisse und Diskussion**

#### **3.1 Bestimmung des für die Kultivierung humaner osteogener Zellen optimalen Basalmediums**

Viele Verfahren des Knochen-Tissue-Engineerings beinhalten eine In-vitro-Kultivierung von aus Knochenmark oder anderen Quellen isolierten Knochenvorläuferzellen. Zum einem ist die Anzahl an MSC, bzw. osteogenen Zellen, die z.B. aus einem Knochenmarksaspirat oder einer Probe autologer Knochenspongiosa zu gewinnen ist, für die Besiedlung eines Trägergerüsts meist nicht ausreichend. Deshalb ist eine In-vitro-Vermehrung der Knochenvorläuferzellen praktisch nicht zu vermeiden. Zum anderen werden die mit Zellen besiedelten Trägergerüste oft vor ihrer Implantation über einen begrenzten Zeitraum noch weiter extrakorporal kultiviert, um eine fortschreitende Differenzierung der MSC einzuleiten und eine schnellere Heilung des Knochendefekts nach der Implantation des Gerüsts zu bewirken. Beide Verfahren erfordern die Kultivierung osteogener Zellen unter Bedingungen, die eine optimale Proliferation und osteogene Differenzierung gewährleisten. Dabei sind nicht nur Auswahl und Konzentration der verwendeten, die Osteogenese stimulierenden Supplemente wichtig, sondern auch die Wahl des am besten geeigneten Nährmediums. Die optimale Dosis und Zusammensetzung der osteogenen Zusatzstoffe sind nach heutigem Kenntnisstand weitgehend geklärt. Für die Kultivierung von primären tierischen und humanen Knochenvorläuferzellen wird meistens ein mit 10 % FBS, 10 mmol/l  $\beta$ -Glycerophosphat, 0,2 mmol/l L-Ascorbat und 10 nmol/l Dexamethason angereichertes Nährmedium benutzt. Dagegen wird ein breites Spektrum an Basalmedien verwendet (z.B. DMEM, DMEM/F-12 (1:1),  $\alpha$ MEM, McCoy's 5A, IMDM, RPMI 1640 und BGJ<sub>b</sub>). Vergleichende Studien, die den Einfluss der Basalmedien auf die Kultivierung osteogener Zellen untersuchen und eine vorteilhafte Auswirkung des einen oder anderen Nährmediums bestätigen, sind dabei rar und widersprüchlich [Jaiswal et al., 1997; Coelho & Fernandes, 2000a].

In Rahmen des EU-Projektes „Tissue reactor“ wurden solche vergleichende Experimente mit primären, aus dem Knochenmark von Ratten isolierten Knochenvorläuferzellen durchgeführt [Barthold, 2003]. Dabei erwies sich die Formulierung ZKT-I als eines der am besten geeigneten Nährmedien, sowohl in Bezug auf die Proliferation als auch auf die Differenzierung osteogener Zellen von Ratten und, wie anschließend durchgeführte Experimente zeigten, auch von Kaninchen (Fargali et al., 2005). Um sicherzustellen, dass ZKT-I-Medium auch für die Kultivierung von humanen primären Knochenvorläuferzellen optimale Voraussetzungen schafft, wurden diese in den drei für die Kultivierung humaner osteogener Zellen am häufigsten verwendeten Basalmedien - DMEM,  $\alpha$ MEM, RPMI 1640 - sowie im ZKT-I-Medium kultiviert. Für diesen Test wurden aus einer heterotopen Ossifikation isolierte osteogene Zellen eingesetzt, die in einem vorab durchgeführten Versuch eindeutige osteogene Eigenschaften (ALP-, Kollagen I-Expression, Mineralisierung der ECM) aufgewiesen hatten. Diese Zellen wurden in der 6. Passage revitalisiert und zuerst über

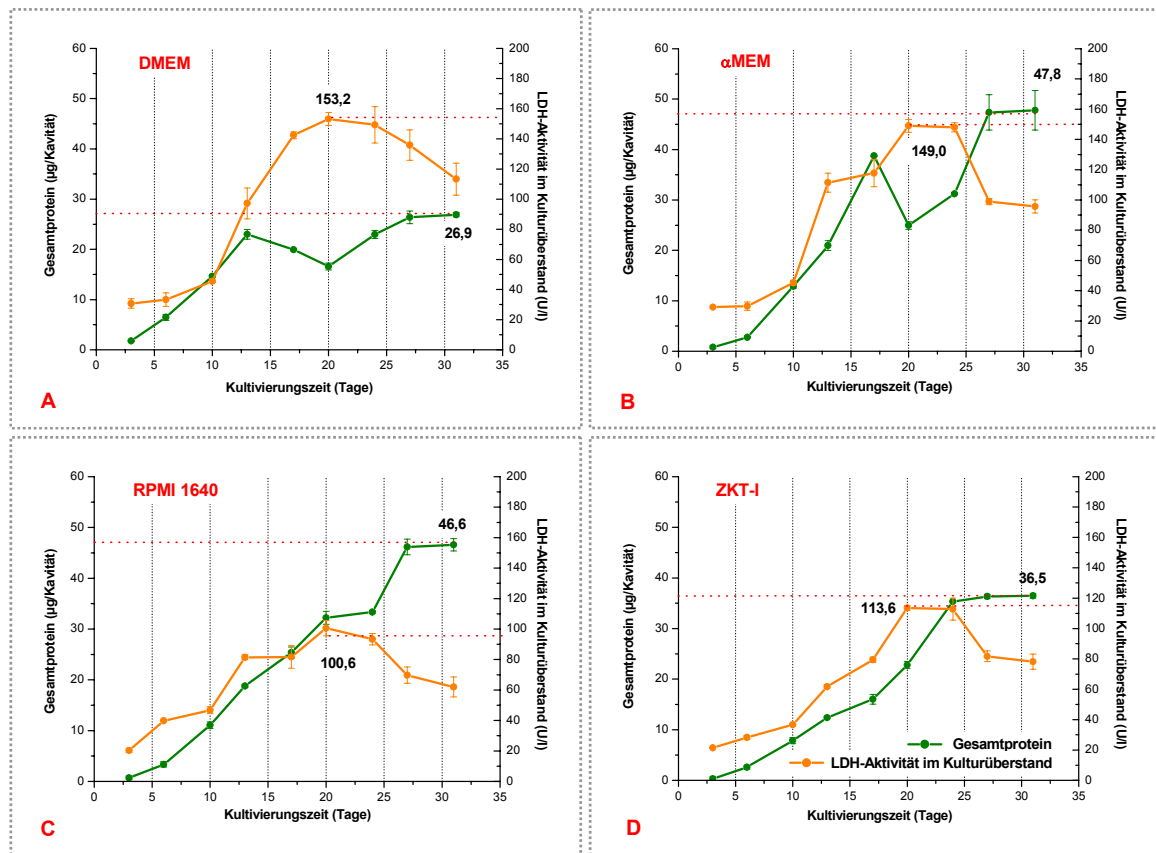
3 Passagen im ZKT-I-Medium mit 10 % HS und osteogenen Supplementen vermehrt. Um die Zellen an ein anderes Nährmedium zu gewöhnen, wurden diese während der 9. Passage in einem der vier zu überprüfenden Medien, die gleichfalls mit 10 % HS und osteogenen Supplementen angereichert wurden, weiterkultiviert. Beim Übergang in die 10. Passage wurden die Zellen in einer Dichte von  $1,2 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> in 48-Loch-Platten und für die RNA-Isolierung in T75-Flaschen, die vorher mit 1%iger Gelatine beschichtet wurden, ausgesät und anschließend in dem entsprechenden Basalmedium über einen Zeitraum von 31 Tagen kultiviert. Medienwechsel und analytische Untersuchungen für die Bestimmung von Proliferation, Vitalität und Differenzierung der osteogenen Zellen wurden zweimal in der Woche vorgenommen. Die Entnahme des Kulturüberstands für die benötigten biochemischen Analysen erfolgte immer 72 h nach dem Wechsel der Medien. Der Test wurde in zwei Wiederholungen durchgeführt. Die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments sind in den Abbildungen 3.1 bis 3.4 dargestellt.

### 3.1.1 Zellproliferation und Zelltod in vier verschiedenen Basalmedien

Ein Anstieg der Konzentration des Gesamtproteins in der Zellkultur (Abb. 3.1) wurde bei allen getesteten Basalmedien über den gesamten Zeitraum von 31 Tagen beobachtet. Dieser biochemische Parameter, der am Ende der Kultivierungszeit allerdings zu einem Übergang in eine Plateauphase neigte, deutete auf ein anhaltendes Zellwachstum und damit auf eine ausreichend hohe Anzahl der zu einer Vermehrung befähigten Osteoprogenitorzellen in den vorliegenden Kulturen hin. Die höchsten Werte der Proteinkonzentration wurden jedoch in Zellkulturen, bei denen als Basalmedium  $\alpha$ MEM oder RPMI 1640 eingesetzt wurden, erreicht. So war am Tag 31 die Konzentration des Gesamtproteins in  $\alpha$ MEM-Kulturen um den Faktor 1,7 höher als in DMEM-Zellkulturen. Die nährstoffreicheren Medien (siehe Tabelle 2.1) gewährleisteten ein erkennbar besseres Wachstum der Zellen. Diese Resultate widersprechen den in den Publikationen von Jaswail et al. [1997] und Coelho et al. [2000a] erwähnten Beobachtungen. Diese Autoren haben nur geringe Unterschiede in der Proliferation osteogener Zellen bei der Verwendung der beiden oben genannten Medien gefunden. Da zwischen Zellproliferation und –differenzierung ein reziproker Zusammenhang besteht (siehe Abb. 1.8), ist das deutlich geringere Zellwachstum in DMEM wahrscheinlich auch mit einer schneller verlaufenden Differenzierung der Osteoprogenitorzellen in diesem Medium zu erklären (siehe 3.1.2).

Die LDH-Aktivität im Kulturüberstand, die als Marker für die Menge der abgestorbenen Zellen diente, erreichte in allen untersuchten Zellkulturen ihr Maximum nach 20 Tagen. Danach war eine kontinuierliche Abnahme der LDH-Aktivität zu registrieren (Abb. 3.1). Eindeutig höhere Werte der LDH-Aktivität wurden jedoch bei der Kultivierung der Zellen im DMEM und  $\alpha$ MEM ermittelt, wo diese am 20. Kultivierungstag um ca. 50 % höher als in RPMI 1640- und ZKT-I-Kulturen waren. Der Verlauf der LDH-Aktivitätskurven zeigte keine

eindeutige Korrelation mit der Zunahme an Gesamtprotein, bzw. mit der Zellproliferation an.



**Abb. 3.1**

Zunahme der Proteinkonzentration und Veränderungen der LDH-Aktivität im Kulturüberstand während einer Langzeitkultivierung humaner osteogener Zellen. Die Zellen wurden in drei häufig verwendeten Basalmedien – DMEM (A), αMEM (B), RPMI 1640 (C) sowie ZKT-I-Medium (D) kultiviert. Alle Medien wurden mit 10 % HS und osteogenen Supplementen angereichert.

Allerdings sind in einer In-vitro-Zellkultur die Prozesse des programmierten und des nekrotischen Zelltods schwer von einander zu trennen. In vivo werden die apoptotischen Körper, die das Endstadium der Apoptose kennzeichnen, von den benachbarten Zellen, oder Osteoklasten phagozytiert [Boyce, 1996]. In einer In-vitro-Kultur landet deren absoluter Großteil dagegen im Kulturüberstand. Die Lysis der im Kulturüberstand vorhandenen apoptotischen Körper kann ebenfalls den Anstieg der LDH-Aktivität verursachen.

Bei der Erforschung des Zelltods in osteogenen Langzeitkulturen haben Lynch et al. [1998] festgestellt, dass das beobachtete zunehmende Absterben der Zellen vorwiegend mit apoptotischen und nicht mit nekrotischen Prozessen verbunden ist. Dabei konnten die Autoren die allmählich ansteigende Apoptose in der In-vitro-Kultur eindeutig mit der fortschreitenden Differenzierung osteogener Zellen korrelieren. So führte eine fehlende Zugabe von L-Ascorbat und β-Glycerolphosphat zu einer Inhibierung der osteogenen Differenzierung und damit zu einer deutlich niedrigeren Intensität der apoptotischen Prozesse. Die im dargestellten Versuch gewonnenen Daten bestätigen offensichtlich diese

Ergebnisse. Im Kulturüberstand der getesteten Zellkulturen wurde allerdings schon während der frühen proliferativen Phase eine geringe LDH-Aktivität registriert. Anscheinend wurden in einer kleinen Anzahl osteogener Zellen apoptotische Prozesse schon während der Isolation und der folgenden Subkultivierung eingeleitet. Die Auslöser dafür waren vermutlich die ausbleibenden interzellulären und Zell-Matrix-Kontakte sowie der Entzug von in der ECM gespeicherten regulatorischen Zytokine [Jilka et al., 1998; Lynch et al., 1998; Manolagas, 2000; Tumber et al., 2000]. Mit zunehmender Ausbildung extrazellulärer Matrix (ECM) und besonders in der Anfangsphase der Mineralisierung wurde eine starke Zunahme der LDH-Aktivität erfasst (siehe auch Abb. 3.2 und 3.4). Dabei wurden die Spitzenwerte der LDH-Aktivität in den Zellkulturen, die den höchsten Mineralisierungsgrad (DMEM- und  $\alpha$ MEM-Kulturen) zeigten, erreicht. Die nachfolgende Verlangsamung der Kollagen I-Synthese und der Matrix-Mineralisierung war dementsprechend mit einer Abnahme der LDH-Aktivität verbunden.

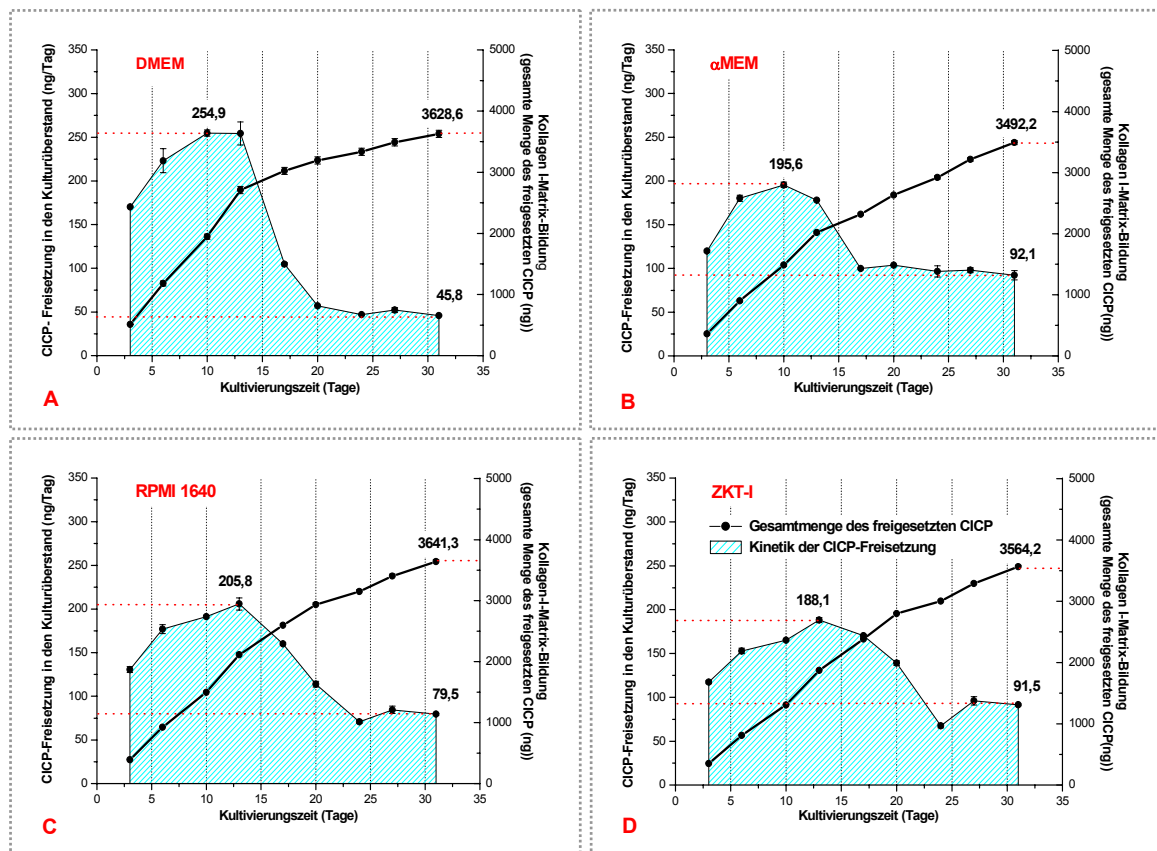
Der programmierte Zelltod ist für eine normale Entwicklung und Integrität des Knochengewebes sehr bedeutend. In vivo, d.h. unter normalen physiologischen Bedingungen, wandeln sich nur 10-20 % der voll ausdifferenzierten Osteoblasten in Osteozyten oder Bone Lining Cells um [Nijwede et al., 1996; Aubin, 1998a]. Eine Intensitätsminderung apoptotischer Prozesse kann daher pathologische Zustände und eine schnelle Alterung des Knochengewebes hervorrufen [Lynch et al., 1998]. Es bleibt allerdings unklar, welcher Prozentsatz der reifen Osteoblasten bei einer extrakorporalen Züchtung des Knochengewebes in die ECM eingebaut werden. Eine kontinuierliche Zunahme der LDH-Aktivität, besonders in den Phasen einer intensiven Matrix-Reifung und Mineralisierung, ist offensichtlich auch bei einer In-vitro-Kultivierung osteogener Zellen als physiologisch bedeutend zu betrachten.

### 3.1.2 Zelldifferenzierung in vier verschiedenen Basalmedien

Parallel zur Zellproliferation und -vitalität wurde die Auswirkung der vier getesteten Basalmedien auf den Verlauf der Differenzierung osteogener Zellen analysiert. Für die Charakterisierung der Phase von Matrix-Bildung und Reifung wurde die Freisetzung des C-terminalen Propeptids von Prokollagen I (CICP) im Kulturüberstand und die ALP-Aktivität untersucht. Dabei wurde sowohl die Dynamik der Kollagen I-Synthese als auch die Gesamtmenge an akkumulierter Kollagen I-Matrix bestimmt. Diese wurde durch das Summieren der bis zu einem gewissen Zeitpunkt einzeln ermittelten CICP-Bildungsraten berechnet (Abb. 3.2). Die Aktivität der ALP, die als einer der wichtigsten Marker der osteogenen Differenzierung gilt und die ihre maximalen Werte während der Matrix-Reifung erreicht [Stein et al., 1996; Aubin, 2000], wurde im Zellschicht (membrangebundene ALP) und im Kulturüberstand bestimmt (Abb. 3.3). Die für osteogene Zellkulturen charakteristische  $\text{Ca}^{2+}$ -Akkumulation in der ECM in Form kristallinen Hydroxylapatits wurde mit dem Calcein-Test und dem Calcium-Kit ermittelt.

### 3.1.2.1 Bildung und Reifung der extrazellulären Matrix

Wie die Abbildung 3.2 zeigt, war der Umfang der angelagerten ECM am Ende der Langzeitkultivierung in allen getesteten Zellkulturen praktisch gleich. Eindeutige Unterschiede wurden dagegen in der Kinetik der Kollagen I-Synthese beobachtet. So war z.B. in Zellkulturen, bei denen als Basalmedium DMEM verwendet wurde, zuerst ein rapider Anstieg und danach ein steiler Abfall der Intensität der Kollagen I-Synthese zu erkennen. In RPMI- und ZKT-I-Kulturen stieg die Kollagen I-Synthese hingegen deutlich langsamer an und verringerte sich im späteren Verlauf viel zögernder. Die maximale Kollagen I-Bildungsrate wurde in allen getesteten Zellkulturen zwischen dem 10. und 13. Kultivierungstag erreicht (Abb. 3.2).



**Abb. 3.2**

Kinetik der CACP-Freisetzung in den Kulturüberstand und die Bildung der Kollagen I-Matrix während einer Langzeitkultivierung humaner osteogener Zellen. Die schwarze Linie zeigt die zu einem bestimmten Zeitpunkt insgesamt freigesetzte Menge an CACP, die direkt proportional zu dem Umfang der angelagerten Kollagen I-Matrix ist. Die Zellen wurden in drei häufig verwendeten Basalmedien – DMEM (A), αMEM (B), RPMI 1640 (C) sowie ZKT-I-Medium (D) kultiviert. Alle Medien wurden mit 10 % HS und osteogenen Supplementen angereichert.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die getesteten Zellkulturen anfänglich einen gewissen Anteil früher Osteoprogenitoren enthalten, die zur Proliferation (Abb. 3.1) und zu einer reichlichen Kollagen I-Bildung (Abb. 3.2) befähigt sind. Mit zunehmender Zelldichte und der Anzahl Kollagen I exprimierender Zellen, insbesondere den synthetisch äußerst aktiven Osteoblasten, die nach und nach aus den Osteoprogenitoren entstehen, nimmt die



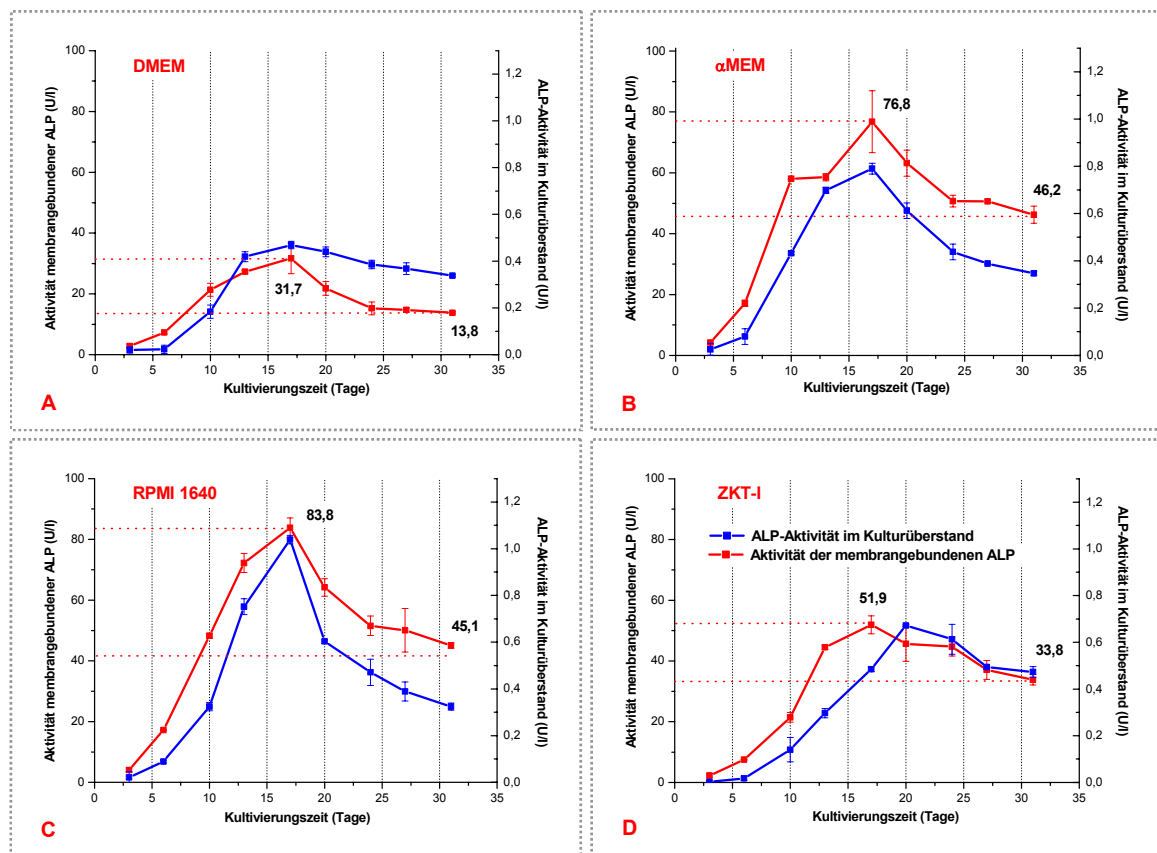
Kollagen I-Bildungsrate allmählich zu. Während der fortlaufenden Differenzierung wandeln sich immer mehr Osteoblasten in Osteozyten um, die nur noch sehr begrenzt Kollagen I exprimieren (siehe Tab. 1.1); die Intensität der Kollagen I-Synthese in den Zellkulturen nimmt dementsprechend ab. Die Geschwindigkeit, mit der die Knochenvorläuferzellen ausdifferenzieren, kann offensichtlich durch die Wahl des einen oder des anderen Basalmediums beeinflusst werden.

Die Vorläuferzellen, die in dem weniger komplexen DMEM kultiviert werden, differenzieren viel schneller aus als diejenigen, die in reichhaltigerem RPMI 1640- oder ZKT-I-Medium kultiviert werden. Offensichtlich sind z.B. am 13. Tag des Experiments in DMEM-Kulturen viel mehr reife Osteoblasten vorhanden, die dann ziemlich schnell in das nächste Stadium der Osteozyten überwechseln, als in ZKT-I-Kulturen. In diesen ist die Anzahl synthetisch aktiver Osteoblasten nach 13 Kultivierungstagen noch vergleichsweise niedrig. Gleichzeitig enthalten ZKT-I-Zellkulturen aber mehr Osteoprogenitorzellen, deren biosynthetische Aktivität etwas niedriger ist und deren allmählicher, viel langsamerer Übergang in spätere Entwicklungsstadien eine hohe Intensität der Kollagen I-Synthese über einen längeren Zeitraum sichert. In allen untersuchten Zellkulturen lagen auch am Ende der Kulturführung noch Kollagen I exprimierende Zellen, d.h. reife Osteoblasten und womöglich auch frühere Differenzierungsstadien der Knochenvorläuferzellen vor. Bei der Kultivierung humaner, aus der Spongiosa des Beckenkamms isolierter Knochenvorläuferzellen, ermittelten Siggelkow et al. [1999] ein ähnliches Kollagen I-Expressionsmuster.

Die höchsten Werte der ALP-Aktivität, d.h. die maximale Anzahl an reifen, stark ALP exprimierenden Osteoblasten wurden in allen untersuchten Zellkulturen am 17. Tag erreicht (Abb. 3.3). Danach nahm die ALP-Aktivität wieder ab, was zweifellos auf den Übergang der Osteoblasten in das Stadium der Osteozyten und auf einen bestimmten Reifegrad der ECM hindeutete. Die Geschwindigkeit, mit der die ALP-Aktivität abnahm, d.h. ALP-positive Osteoblasten in ALP-negative Osteozyten ausdifferenzierten, war ebenfalls von dem verwendeten Basalmedium abhängig. In DMEM-Kulturen passierte dieser Übergang, wie schon erwartet, viel schneller als in anderen getesteten Zellkulturen. Im Vergleich zum maximalen Wert am Tag 17 war am Ende der Kultivierung die Aktivität membrangebundener ALP in DMEM-Kulturen um 56,5 %, in  $\alpha$ MEM-Kulturen um 39,8 %, in RPMI 1640-Kulturen um 46,2 % und in ZKT-I-Kulturen nur um 34,9 % niedriger. Dabei wurde eine klare Korrelation zwischen den Werten an membrangebundener und löslicher ALP registriert.

Die Unterschiede im Expressionsgrad der ALP sind dagegen nicht eindeutig zu interpretieren. Geringere Werte der ALP-Aktivität bei der Kultivierung in DMEM und ZKT-I könnte man teilweise mit einer niedrigeren Zahl an Zellen begründen. Vermutlich wird die ALP-Synthese jedoch auf eine andere Weise reguliert. Auch andere Forschergruppen, die osteogene Zellen in DMEM und  $\alpha$ MEM unter vergleichbaren Bedingungen kultivierten, beobachteten in DMEM-Zellkulturen deutlich niedrigere Werte der ALP-Aktivität

[Jaiswal et al., 1997; Coelho et al., 2000]. Allerdings waren diese gleichzeitig auch mit einem geringeren Mineralisierungsgrad dieser Kulturen verbunden.



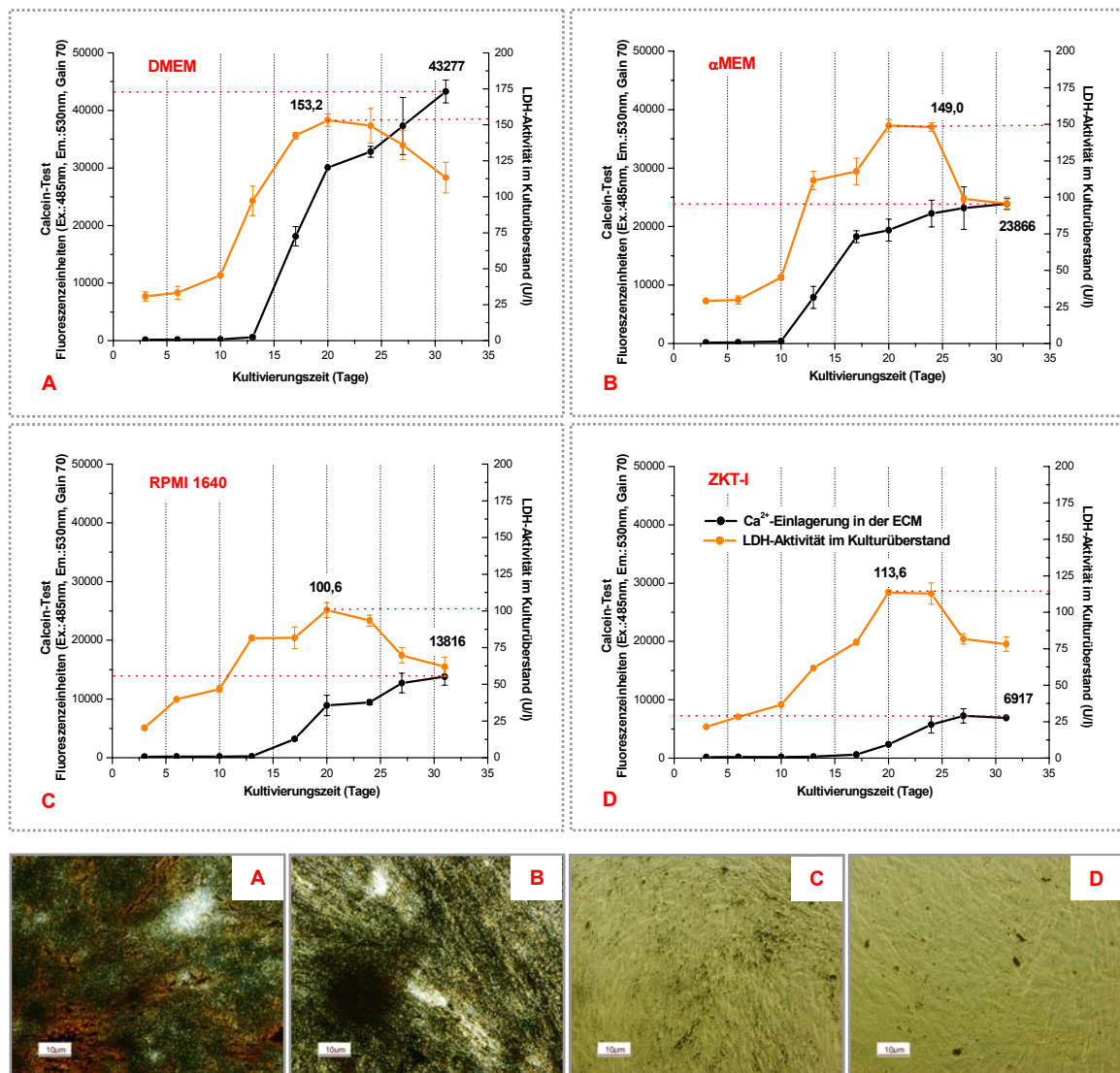
**Abb. 3.3**

Veränderungen der ALP-Aktivität während einer Langzeitkultivierung humaner osteogener Zellen. Die Zellen wurden in drei häufig verwendeten Basalmedien – DMEM (A), αMEM (B), RPMI 1640 (C) sowie ZKT-I-Medium (D) kultiviert. Alle Medien wurden mit 10 % HS und osteogenen Supplementen angereichert.

### 3.1.2.2 Mineralisierung der extrazellulären Matrix

Der Mineralisierungsgrad der ECM und der Verlauf der Mineraleinlagerung in den getesteten Zellkulturen waren besonders stark von dem verwendeten Basalmedium abhängig (Abb. 3.4). Den höchsten Mineralisierungsgrad und eine schnell verlaufende Akkumulation von  $\text{Ca}^{2+}$  wiesen diejenigen osteogenen Zellkulturen auf, bei denen als Basalmedium DMEM verwendet wurde. Im Vergleich zu DMEM zeigten die αMEM-Kulturen eine etwas geringere und weniger intensiv ansteigende Mineralisierung. In RPMI 1640- und ZKT-I-Kulturen verlief der Prozess der Mineraleinlagerung deutlich langsamer, so dass auch am Ende der Langzeitkultivierung die ECM noch einen geringen Mineralisierungsgrad aufwies. Diese Ergebnisse wurden durch ein nachfolgendes Experiment nochmals bestätigt (Abb. 3.5). In diesem Versuch wurden die aus einer heterotopen Ossifikation isolierten Zellen durch Knochenvorläuferzellen, die aus der Spongiosa gewonnen wurden, ersetzt und in αMEM und ZKT-I-Medium unter gleichen Bedingungen kultiviert. Auch bei diesem Zellmaterial wurde die Mineralisierung der ECM zweifellos durch das verwendete Basalmedium beeinflusst. So war

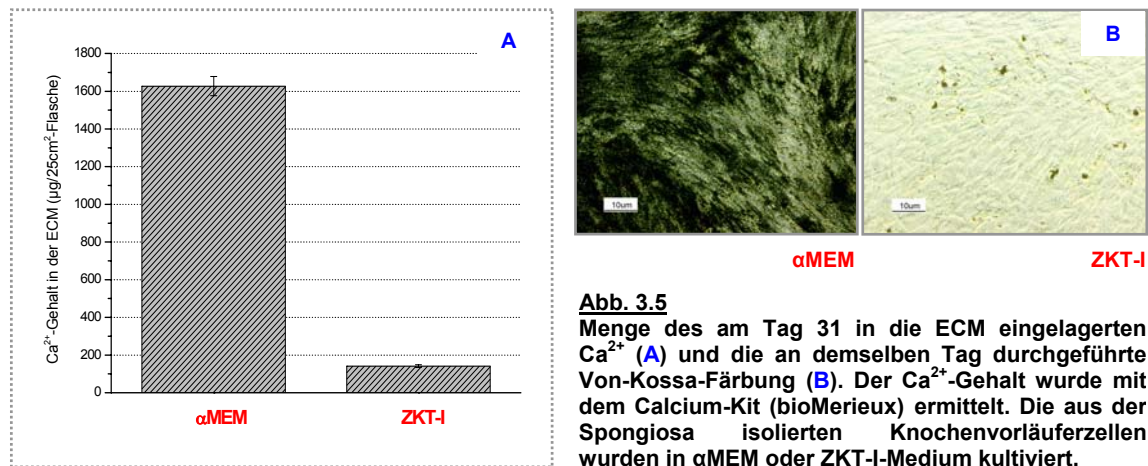
in den  $\alpha$ MED-Kulturen die Menge des in der ECM eingelagerten  $\text{Ca}^{2+}$  am Schluss des Experiments sogar 11,5-mal höher als bei der Kultivierung in ZKT-I-Medium (Abb. 3.5A).



**Abb. 3.4**

Mineralisierung der ECM (Calcein-Test und am Tag 31 durchgeführte Von-Kossa-Färbung) und die Veränderungen der LDH-Aktivität während einer Langzeitkultivierung humaner osteogener Zellen. Die Zellen wurden in drei häufig verwendeten Basalmedien – DMEM (A),  $\alpha$ MED (B), RPMI 1640 (C) sowie ZKT-I-Medium (D) kultiviert. Alle Medien wurden mit 10 % HS und osteogenen Supplementen angereichert.

In allen untersuchten Zellkulturen wurde eine zeitliche Übereinstimmung zwischen dem Beginn der Mineralisierung und der beginnenden Abnahme der Kollagen I-Synthese festgestellt. Zu diesem Zeitpunkt, der zwischen dem 10. und 13. Kultivierungstag lag (siehe Abb. 3.2), war offenbar nicht nur ein bestimmter Umfang der angelegten Kollagen I-Matrix sondern auch der notwendige Gehalt an nichtkollagenösen Proteinen und eine ausreichend hohe ALP-Aktivität erreicht. Diese Verhältnisse ermöglichten die Einleitung der Mineraleinlagerung. Der fortschreitende Mineralisierungsprozess beschleunigte anscheinend die Ausdifferenzierung der Osteoblasten; entsprechend verringerte sich die Kollagen I-Expression.



**Abb. 3.5**  
Menge des am Tag 31 in die ECM eingelagerten Ca<sup>2+</sup> (A) und die an demselben Tag durchgeführte Von-Kossa-Färbung (B). Der Ca<sup>2+</sup>-Gehalt wurde mit dem Calcium-Kit (bioMerieux) ermittelt. Die aus der Spongiosa isolierten Knochenvorläuferzellen wurden in  $\alpha$ MEM oder ZKT-I-Medium kultiviert.

Im Überstand der Zellkulturen mit stärker ausgeprägter Mineralisierung (DMEM,  $\alpha$ MEM) wurden eindeutig höhere Werte an LDH-Aktivität registriert, was auf eine höhere Zahl abgestorbener bzw. apoptotischer Zellen hindeutete (siehe auch 3.1.1). Lynch et al. [1998] zeigten am Beispiel osteogener Rattenzellen, dass schon in den mehrschichtigen, prämineralisierten 3D-Knötchen der ECM (Nodules) viel mehr apoptotische Zellen als in den Zwischenräumen vorzufinden sind. Mit dem Beginn der Mineralisierung beobachteten sie einen rapiden Anstieg absterbender Zellen. Der Großteil davon war im mittleren Bereich des Knötchens, d.h. im Initiierungszentrum der Mineraleinlagerung lokalisiert. In späteren Differenzierungsstadien waren die apoptotischen Zellen über das gesamte Knötchen zerstreut und auch in den Sektoren zwischen den einzelnen Knötchen in größerer Anzahl vorzufinden. Die apoptotischen Prozesse werden womöglich durch den starken, lokalen Anstieg der Konzentration von anorganischem Phosphat (P<sub>i</sub>) ausgelöst [Meleti et al., 2000; Boyan et al., 2000]. Dieses entsteht in den Mineralisierungszentren unter der ALP-Katalyse aus dem in Kulturmedium vorhandenen  $\beta$ -Glycerophosphat. Osteoblasten, die reichlich ALP exprimieren sind in den 3D-Knötchen in einer besonders hohen Zahl anzutreffen [Bellows et al., 1992; Schecroun & Deloye, 2003]. Die Konzentration des P<sub>i</sub> in diesen Zonen kann den normalen extrazellulären Gehalt von ca. 1,3 mmol/l um ein Vielfaches überschreiten.

In vivo ist der in den Knochenresorptionsbereichen entstehende Ca<sup>2+</sup>- und P<sub>i</sub>-Gradient ein wichtiger Faktor, der die proliferative und biosynthetische Aktivität osteogener Zellen reguliert [Meleti et al., 2000]. Eine geringe Erhöhung des P<sub>i</sub>-Gehalts in den Grenzgebieten der Resorption fördert wahrscheinlich die Proliferation und Differenzierung von Osteoprogenitoren. Zellen, die höheren Konzentrationen an anorganischem Phosphat ausgesetzt werden, unterliegen dagegen der Apoptose. Die in Abbildung 3.4 dargestellten Ergebnisse korrelieren gut mit diesen Erkenntnissen. Der schnelle Anstieg der LDH-Aktivität im Kulturüberstand der DMEM- und  $\alpha$ MEM-Kulturen ist deutlich mit dem Beginn der Matrix-Mineralisierung nach 10-13 Kultivierungstagen verbunden. In Zellkulturen, die einen viel niedrigeren Mineralisierungsgrad aufweisen (RPMI 1640- und ZKT-I-Kulturen), ist die

LDH-Freisetzung weniger ausgeprägt und wahrscheinlich mit einer allmählichen Ausbildung der prämineralisierten Knötchen der ECM assoziiert.

### 3.1.3 $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen in Basalmedien und deren Einfluss auf den Mineralisierungsprozess

Bei der Analyse der Ursachen einer so unterschiedlichen Mineraleinlagerung wurden auch die Zusammensetzungen der vier im Experiment verwendeten Basalmedien miteinander verglichen.

Neben einigen Unterschieden in der Kombination von und dem Gehalt an Aminosäuren und Vitaminen, fielen besonders die Differenzen in der Konzentration von Calciumsalzen und Phosphaten auf. Diese sind zweifellos als potentielle  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{P}_i$ -Quellen - und damit als Faktoren, die womöglich den Mineralisierungsprozess stark beeinflussen - anzusehen. Die Konzentrationen von  $\text{Ca}^{2+}$  und anorganischen Phosphat in den vier getesteten Medien sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Die gewonnenen Daten zeigen eindeutig, dass der Mineralisierungsgrad der ECM mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen im Kulturmedium korreliert, d.h. die Zellkulturen, die in Medien mit niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt geführt wurden, zeigten nur eine geringe oder fast keine Mineraleinlagerung (Abb. 3.4).

**Tabelle 3.1**

**Die Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$  und anorganischen Phosphat in den vier verwendeten Kulturmedien**

Medium	$\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration						$\text{PO}_4^{3-}$ -Konzentration	
	im Basalmedium (errechnet)		im Kulturmedium mit 10 % HS und Antibiotikum (errechnet)		im Kulturmedium mit 10 % HS und Antibiotikum (gemessen mit Calcium-Kit)		im Basalmedium	
	mg/l	mmol/l	mg/l	mmol/l	mg/l	mmol/l	mg/l	mmol/l
<b>DMEM</b>	72,21	<b>1,80</b>	64,27+7,39*= <b>71,66</b>	<b>1,79</b>	70,10±5,14	<b>1,75</b>	86,02	<b>0,91</b>
<b><math>\alpha</math>MEM</b>	72,21	<b>1,80</b>	64,27+7,39*= <b>71,66</b>	<b>1,79</b>	68,12±5,09	<b>1,70</b>	96,35	<b>1,01</b>
<b>RPMI 1640</b>	16,97	<b>0,42</b>	15,10+7,39*= <b>22,49</b>	<b>0,56</b>	17,99±3,90	<b>0,45</b>	535,04	<b>5,63</b>
<b>ZKT-I</b>	35,79	<b>0,89</b>	31,85+7,39*= <b>39,24</b>	<b>0,98</b>	37,45±4,58	<b>0,94</b>	92,66	<b>0,98</b>

\* - 100 ml des verwendeten HS enthalten 7,39 mg  $\text{Ca}^{2+}$ . Dieser Wert wurde mit dem Calcium-Kit (bioMerieux) ermittelt.

Bellows et al. [1992] haben in einer Studie mit fötalen osteogenen Rattenzellen belegt, dass für die Initiierung der Mineraleinlagerung eine bestimmte Konzentration an  $\text{P}_i$  im Kulturmedium, die 2-5 mmol/l entspricht, benötigt wird. Diese Konzentration kann entweder durch eine extra Zugabe von anorganischen Natriumsalzen ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) oder auch indirekt durch die Beigabe des organischen  $\beta$ -Glycerophosphats ( $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_6\text{PNa}_2$ ) erreicht werden. In einer osteogenen Kultur, die genügend ALP-produzierende Knochenzellen enthält, wird das beigefügte  $\beta$ -Glycerophosphat durch die ALP schnell in

anorganisches Phosphat ( $P_i$ ) konvertiert [Bellows et al., 1992; Boskey, 1998; Coelho et al., 2000b]. Der gesamte Mineralisierungsprozess kann dabei in eine Initiierungs- und in eine Progressionsphase eingeteilt werden [Bellows et al., 1992]. Für die Einleitung der Mineraleinlagerung sind eine zusätzliche Beigabe von anorganischen oder organischen Phosphat und eine ausreichend hohe ALP-Aktivität unbedingt notwendig. In der Progressionsphase schreitet der Mineralisierungsprozess dann unabhängig von der ALP-Aktivität fort und eine Extragabe an Phosphaten ist nicht mehr erforderlich. Auch Coelho et al. [2000b] wiesen bei der Kultivierung osteogener, aus dem humanen Knochenmark isolierter Zellen nach, dass die Matrix-Mineralisierung nur in den Zellkulturen, bei denen  $\beta$ -Glycerophosphat zugegeben wird, stattfindet.

**Tabelle 3.2**

**$Ca^{2+}$ -Konzentration und Osmolarität in ZKT-I-Medium mit normalem und erhöhtem  $Ca^{2+}$ -Gehalt**

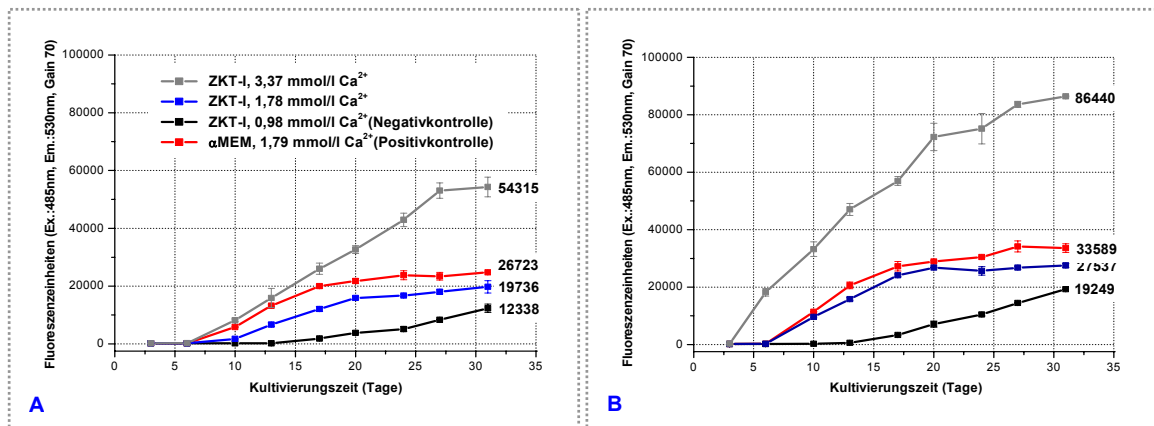
Nr.	ZKT-I Basalmedium (errechnet)		ZKT-I-Medium mit 10 % HS und Antibiotikum (errechnet)		ZKT-I-Medium mit 10 % HS und Antibiotikum, gemessen mit Calcium-Kit		Osmolarität im ZKT-I-Medium mit 10 % HS und Antibiotikum
	mg/l	mmol/l	mg/l	mmol/l	(mg/l)	mmol/l	
1	35,79	<b>0,89</b>	31,85+7,39*= <b>39,24</b>	<b>0,98</b>	37,45±4,58	<b>0,94</b>	332,7±2,1*
2	71,58	<b>1,79</b>	63,71+7,39*= <b>71,10</b>	<b>1,78</b>	72,64±3,10	<b>1,82</b>	331,7±0,6*
3	143,16	<b>3,58</b>	127,41+7,39*= <b>134,80</b>	<b>3,37</b>	145,38±6,32	<b>3,63</b>	335,3±0,6*

\* - 100 ml des verwendeten HS enthalten 7,39 mg  $Ca^{2+}$ . Dieser Wert wurde mit dem Calcium-Kit (bioMerieux) ermittelt.

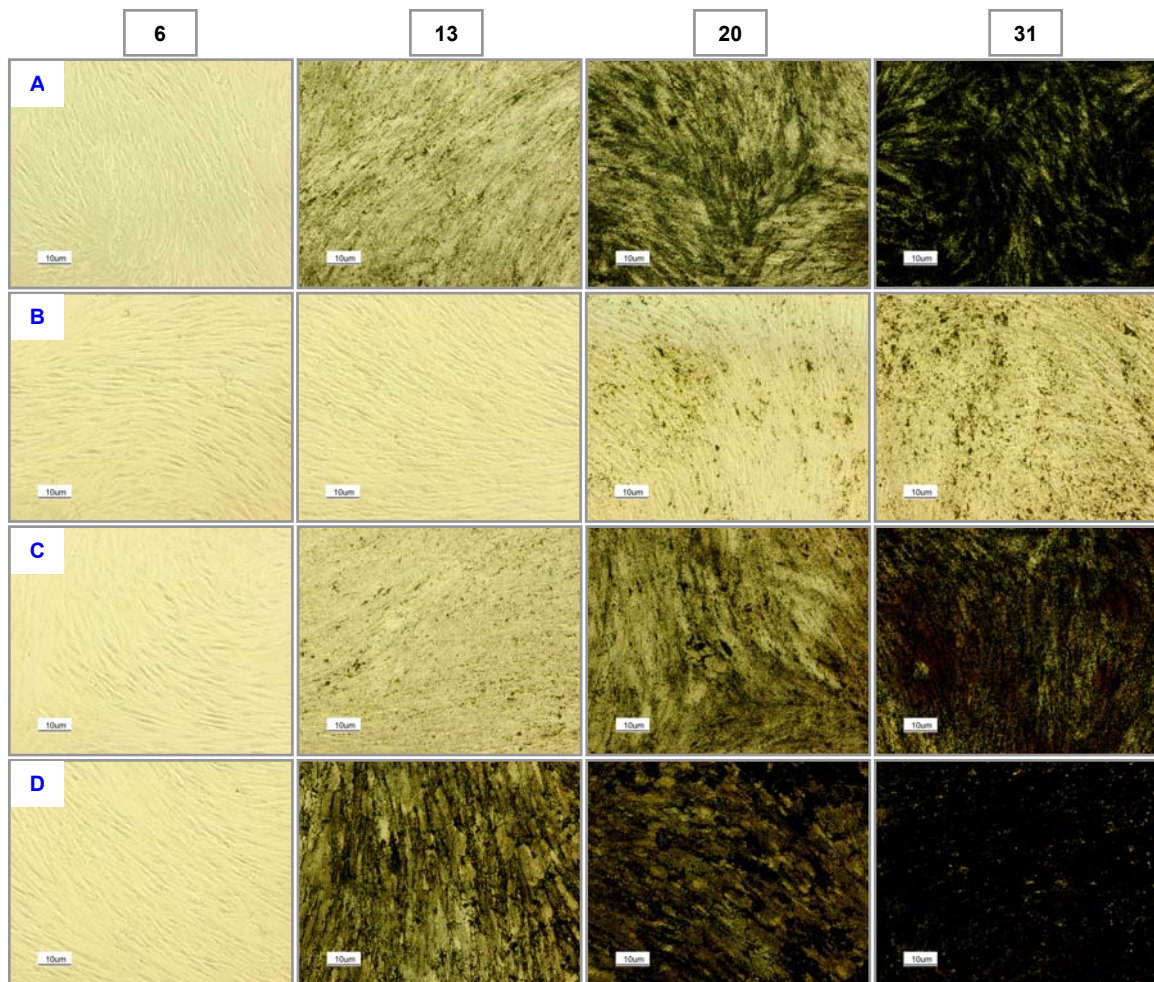
\* - Die Osmolarität in den Kulturmedien wurde mit dem Osmometer Automatic (Knauer, Bad Homburg) bestimmt.

Da alle im Rahmen dieser Arbeit getesteten Medien mit 10 mmol/l  $\beta$ -Glycerophosphat supplementiert wurden und alle untersuchten Zellkulturen ALP-positiv waren, kann ein  $P_i$ -Defizit offensichtlich nicht die Ursache einer geringen Matrix-Mineralisierung sein (siehe Tab. 3.1). Diese Annahme bestätigt auch die Kultivierung der Zellen im RPMI 1640-Medium. Der  $P_i$ -Gehalt ist in diesem Nährmedium ausreichend hoch (5,65 mmol/l); trotzdem weisen die RPMI 1640-Zellkulturen einen vergleichsweise niedrigen Mineralisierungsgrad auf. Zur Überprüfung der Annahme, dass der Auslöser einer geringen Mineralisierung eine zu niedrige  $Ca^{2+}$ -Konzentration im Kulturmedium ist, wurden sowohl die aus der heterotopen Ossifikation als auch die aus der Knochenspongiosa isolierten Knochenvorläuferzellen in  $\alpha$ MEM (Positivkontrolle) und im ZKT-I-Medium mit unterschiedlichen  $Ca^{2+}$ -Gehalten kultiviert (Tab. 3.2, Abb. 3.6, 3.7). In einem Versuchsansatz wurde die  $Ca^{2+}$ -Konzentration in dem ZKT-I-Basalmedium nicht verändert (Negativkontrolle), in zwei anderen dagegen zweifach bzw. vierfach höher gesetzt. Die Osmolarität des Kulturmediums blieb dabei praktisch unverändert.



**Abb. 3.6**

Nachweis der Mineralisierung mit dem Calcein-Test. Aus einer heterotopen Ossifikation (A) und der Knochenspongiosa (B) isolierte Zellen wurden in αMEM oder ZKT-I-Medium mit unterschiedlichem Ca<sup>2+</sup>-Gehalt kultiviert.

**Abb. 3.7**

Von-Kossa-Färbung (Nachweis der Mineralisierung) am Tag 6, 13, 20 und 31. Die aus einer heterotopen Ossifikation isolierten Knochenvorläuferzellen wurden in αMEM (1,79 mmol/l Ca<sup>2+</sup>) (A) oder ZKT-I-Medium mit unterschiedlichem Ca<sup>2+</sup>-Gehalt kultiviert: 0,98 mmol/l (B), 1,78 mmol/l (C) und 3,37 mmol/l (D).

Die im Experiment eingesetzten Zellen wurden in der 6. Passage (aus der heterotopen Ossifikation isolierte Zellen) oder 2. Passage (aus der Spongiosa isolierte Zellen)

revitalisiert und über vier Passagen in ZKT-I-Medium mit 10 % HS und osteogenen Supplementen vorkultiviert. Beim Übergang in die 10. bzw. 6. Passage wurden die Zellen in einer Dichte von  $1,2 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> in Kavitäten der 48-Loch-Platten im selben Medium ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium gegen das jeweilige spezifische Medium, das ebenfalls mit 10 % HS und osteogenen Supplementen angereichert wurde, ausgetauscht und die Zellen über einen Zeitraum von 31 Tagen unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) kultiviert. Zweimal pro Woche wurde ein Medienwechsel vorgenommen, die Zellschicht für den Calcein-Test und die Von-Kossa-Färbung wurde an den Tagen 3, 6, 10, 13, 17, 20, 23, 27 und 31 der Kultivierung fixiert.

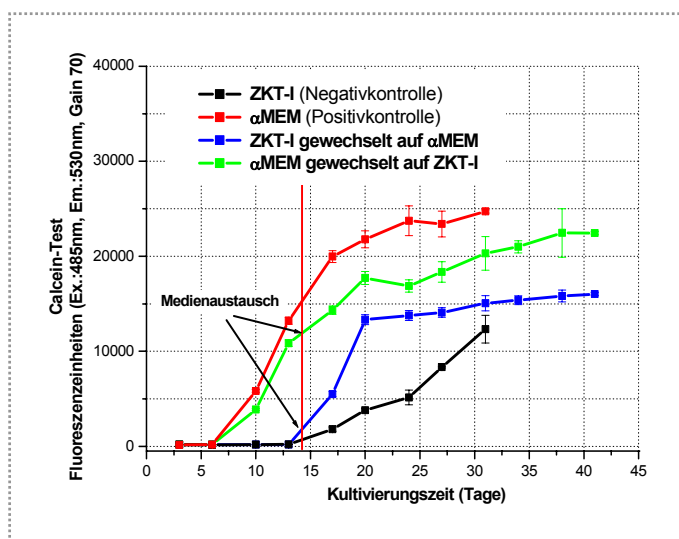
In den Abbildungen 3.6 und 3.7 ist deutlich zu sehen, dass durch die Erhöhung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im ZKT-I-Medium der Mineralisierungsprozess stark beeinflusst werden konnte. So waren Mineralisierungsgrad und Verlauf der Mineraleinlagerung im ZKT-I-Medium mit dem Ca<sup>2+</sup>-Gehalt von 1,79 mmol/l mit der Mineralisierung im  $\alpha$ MEM vergleichbar. Offensichtlich wird für die Einleitung der Mineraleinlagerung neben einem bestimmten Umfang und Reifegrad der ECM, ausreichender ALP-Aktivität und einer extra Beigabe von organischem oder anorganischem Phosphat auch eine gewisse Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im extrazellulären Raum benötigt. Dabei darf der Gehalt von Ca<sup>2+</sup> im Medium allerdings nicht zu hoch gesetzt werden, um ein frühes, spontanes und damit unphysiologisches Ausfallen von Calciumphosphaten, die so genannte Calcifizierung, zu vermeiden.

Eine Calcifizierung, d.h. eine Akkumulation von Calciumsalzen in Geweben bei dauerhaft erhöhten Calcium- und Phosphatkonzentrationen muss eindeutig von einer Ossifikation bzw. von einer Biomineralisierung unterschieden werden [Boskey, 1998; Boskey, 2003; Jähnen-Dechent, 2004]. Im Knochengewebe wird die Mineraleinlagerung von den knochenbildenden Zellen aktiv gesteuert. Einerseits exprimieren sie Kollagen I und die nichtkollagenösen Proteine (Knochen-Sialoprotein, Biglycan, Osteonectin, Osteopontin, Osteocalcin, Matrix-Gla-Protein), die sowohl eine organische Matrice für die Mineraleinlagerung erzeugen als auch Entstehung, Wachstum, Größe und Ausrichtung der Hydroxylapatit-Kristalle bestimmen (siehe Tab. 1.2). Andererseits regulieren die Zellen den Ionentransport und produzieren Enzyme, welche die Funktion der zuvor synthetisierten Proteine beeinflussen [Boskey, 1996; Boskey, 1998; Zhang et al., 2002; McDonald, 2004]. Ist die Konzentration von Ca<sup>2+</sup> und P<sub>i</sub> im extrazellulären Raum zu hoch und der Gehalt der regulatorischen Proteine nicht ausreichend, verläuft die initiierte Mineralisierung offensichtlich unkontrolliert weiter; ist die Konzentration eines der beteiligten Ionen dagegen zu niedrig, findet die Mineraleinlagerung nicht statt oder sie erfolgt deutlich langsamer. Um festzustellen, ob die Mineralisierung auf einer Ossifikation oder einer Calcifizierung beruht, muss der zeitliche Abstand zwischen der Ausbildung des Osteoids und dem Beginn der Mineraleinlagerung ermittelt werden [Zhang et al., 2002]. Dieser



Abstand, der auch als „osteoid maturation period“ oder „mineralization lag time“ bezeichnet wird, darf bei einer ungestörten, kontrolliert verlaufenden Mineraleinlagerung offensichtlich weder zu kurz noch zu lang ausfallen. Bei den meisten getesteten Zellkulturen betrug dieser Zeitraum ca. 6 Tage (Abb. 3.6). Eine starke Verkürzung der „mineralization lag time“, die z. B. bei der Verwendung von ZKT-I-Medium mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt von 3,36 mmol/l zu beobachten war, deutet offensichtlich auf eine Calcifizierung hin (Abb. 3.6B).

Um eine Balance zwischen den Prozessen der Matrix-Bildung, -Reifung und -Mineralisierung zu gewährleisten, ist es bei der Aufstellung zuverlässiger In-vitro-Modellsystemen wichtig eine optimale Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{P}_i$  im Kulturmedium einzuhalten. Für  $\text{Ca}^{2+}$  liegt das Konzentrationsoptimum wahrscheinlich zwischen 1,5 und 2,0 mmol/l; für  $\text{P}_i$  im Bereich zwischen 2 und 5 mmol/l. Ein aufeinander folgender Einsatz von Medien mit einem niedrigen und einem hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt könnte jedenfalls für die Steuerung des Mineralisierungsprozesses und damit für Anwendungen des Knochen-Tissue-Engineerings von Interesse sein.



**Abb. 3.8**

Die aus einer heterotopen Ossifikation isolierten osteogenen Zellen wurden in αMEM (1,79 mmol/l  $\text{Ca}^{2+}$ ) und ZKT-I-Medium (0,98 mmol/l  $\text{Ca}^{2+}$ ) kultiviert. Nach 14 Kultivierungstagen wurde fortan in zwei Ansätzen des Experiments das jeweils andere Medium beim Medienwechsel eingesetzt.

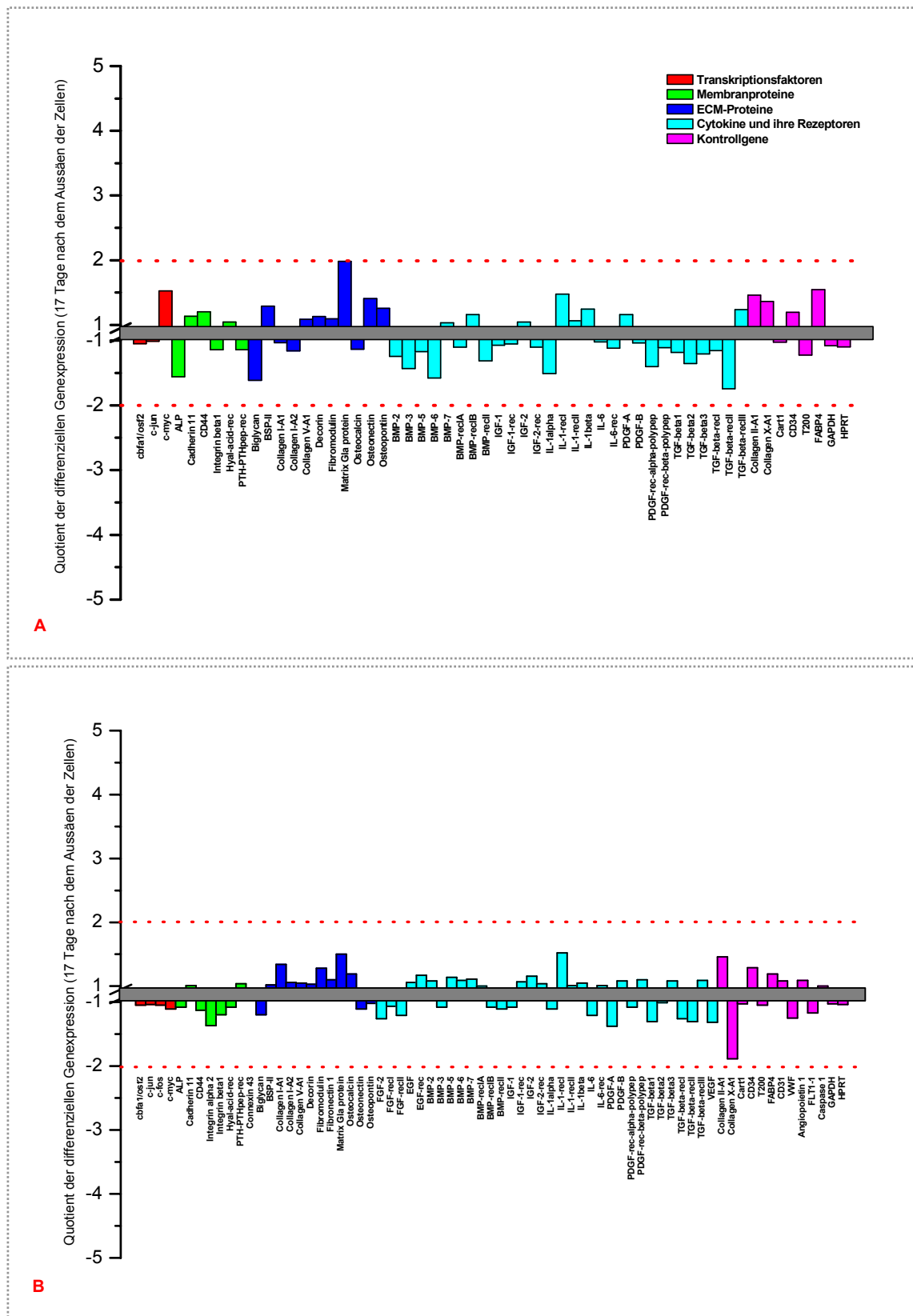
Abbildung 3.8 zeigt die Ergebnisse eines in diesem Zusammenhang durchgeführten Versuchs, in dem die Auswirkung eines Wechsels der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf die Mineraleinlagerung geklärt wurde. Die aus einer heterotopen Ossifikation isolierten Zellen wurden zuerst unter den oben beschriebenen Bedingungen (s.S. 118-119) in αMEM oder ZKT-I-Medium mit normalem  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt (0,98 mmol/l) kultiviert. 14 Tage nach dem Aussäen der Zellen wurde in zwei Ansätzen des Versuchs auf das jeweils andere Medium gewechselt. Dadurch wurden die anfänglich in αMEM kultivierten Zellen in ZKT-I-Medium, welches nur etwa die Hälfte an  $\text{Ca}^{2+}$  enthält, die zuerst im ZKT-I-Medium kultivierten Zellen hingegen in αMEM mit zweimal mehr  $\text{Ca}^{2+}$ , weiter kultiviert. Es ist eindeutig zu sehen, dass der Verlauf der Mineraleinlagerung durch Austausch des Mediums beeinflusst werden konnte. In Zellkulturen, bei denen αMEM gegen ZKT-I-Medium ersetzt wurde, lief der Mineralisierungsprozess zwar weiter, seine Geschwindigkeit war jedoch verringert und der

gleiche Mineralisierungsgrad wie in Zellkulturen, die nur mit  $\alpha$ MEM kultiviert wurden, wurde selbst nach einer längeren Kultivierungszeit von 42 Tagen nicht erreicht. In osteogenen Kulturen, die anfangs in ZKT-I und danach in  $\alpha$ MEM kultiviert wurden, war nach dem vorgenommenen Medienaustausch ein sofortiger, rapider Anstieg der Mineraleinlagerung zu beobachten, der allerdings schon ab dem 20. Kultivierungstag in ein Plateau überwechselte. Zur präzisen und eindeutigen Interpretation der gewonnenen Daten sind offensichtlich weitere Experimente notwendig, bei denen parallel zur Matrix-Mineralisierung auch die Proliferation und Differenzierung osteogener Zellen möglichst ausführlich charakterisiert werden. Für nachfolgende In-vitro-Versuche wäre es sinnvoller nur ein einziges Basalmedium zu verwenden, etwa ZKT-I, und in ihm die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nachträglich zu verändern. Damit würde der multifaktorielle Stress, dem die Zellen durch den Übergang zu einer Kultivierung in einem anderen Nährmedium ausgesetzt werden, abgemildert.

Calcium ist ein allgegenwärtiger intrazellulärer Botenstoff, der diverse zelluläre Prozesse, einschließlich der Genexpression und Proliferation kontrolliert [Bootmann et al., 2001]. Es ist bewiesen, dass in der Membran knochenbildender Zellen neben einem  $\text{P}_i$ -Transportsystem auch Calcium-Rezeptoren (CaR) und -Kanäle vorzufinden sind [Caverzasio & Bonjour, 1996; McDonald, 2004]. Deshalb können die Zellen auf einen veränderten  $\text{P}_i$ - oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt im extrazellulären Raum auch unabhängig von systemischen Faktoren reagieren. Niedrige  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen z.B. inhibieren das postkonfluente Wachstum, die Kollagen I-Synthese und den Mineralisierungsprozess; mäßig erhöhte fördern dagegen die Proliferation und Differenzierung osteogener Zellen; anhaltend hohe leiten apoptotische Prozesse ein [Chang et al., 1999; Huang et al., 2001; Dvorak & Riccardi, 2004; McDonald, 2004]. Die molekularen Mechanismen, die diese Reaktionen hervorrufen, sind zurzeit noch nicht endgültig geklärt [Dvorak & Riccardi, 2003]. Der durchgeführte Medientest belegt aber eindeutig, dass bei der Kultivierung knochenbildender Zellen die extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration als ein sehr wichtiger Faktor zu betrachten ist.

#### **3.1.4 Vergleich der Genexpression in osteogenen Zellen, die in $\alpha$ MEM und ZKT-I-Medium kultiviert wurden**

Um festzustellen, ob und welche Unterschiede in der Expression knochenspezifischer Gene Medien mit unterschiedlichem  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt hervorrufen, wurde nach 17 Tagen, d.h. zur Halbzeit des Langzeitexperiments, mit ZKT-I- als auch  $\alpha$ MEM-Zellkulturen eine Microarray-Analyse der differentiellen Genexpression durchgeführt. Die Unterschiede in der Expression knochenspezifischer Gene und der Kontrollgene wurde sowohl bei den aus einer heterotopen Ossifikation als auch bei den aus der Knochenspongiosa isolierten osteogenen Zellen untersucht. Dabei wurden die in  $\alpha$ MEM kultivierten Zellen als Referenz, die in dem ZKT-I-Medium kultivierten Zellen als Analyse definiert.

**Abb. 3.9**

Genexpression in ZKT-I-Zellkulturen (Analyse) im Vergleich zu  $\alpha$ MEM-Zellkulturen (Referenz). **A** – aus einer heterotopen Ossifikation, **B** – aus der Knochenspongiosa isolierte osteogene Zellen. Die rote punktierte Linie kennzeichnet die Signifikanzgrenze der differentiellen Genexpression. Die Gesamt-RNA für die Microarray-Analyse wurde 17 Tage nach dem Aussäen der Zellen isoliert. Beide Medien wurden mit 10 % HS und osteogenen Supplementen angereichert.

Wie Abbildung 3.9 zeigt, wurden im Expressionsgrad der untersuchten Gene bei der Kultivierung in beiden Medien keine bedeutenden Unterschiede registriert. Alle ermittelten Quotienten der differentiellen Genexpression befanden sich unterhalb der Grenze einer zweifachen Genregulation, d.h. unterhalb der Grenze der Reproduzierbarkeit des Experiments (siehe auch 2.4.10) und konnten damit nicht als statistisch relevant betrachtet werden. Da die Unterschiede auf der Ebene der Proteinexpression (Kollagen I-Synthese, ALP-Aktivität) im Bereich der anderthalbfachen Regulation lagen (siehe Abb. 3.10), stimmten die Ergebnisse der durchgeführten Genexpressionsanalyse mit den Daten der In-vitro-Tests überein. Die sehr schwache Mineralisierung der ECM bei der Verwendung von ZKT-I-Medium ist offensichtlich mit dem niedrigeren  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt und nicht mit einer ungenügenden, stark reduzierten Expression nichtkollagenöser, die Mineralisierung initiiierender Matrixproteine (Knochen-Sialoprotein, Biglycan) verbunden. Es ist aber nicht auszuschließen, dass gewisse Differenzen im Genexpressionsprofil durch die Veränderung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration hervorgerufen werden, welche jedoch mit dem vorhandenen Microarray, der komplementäre Oligonukleotide für nur 73 Gene enthält, nicht erfasst werden konnten.

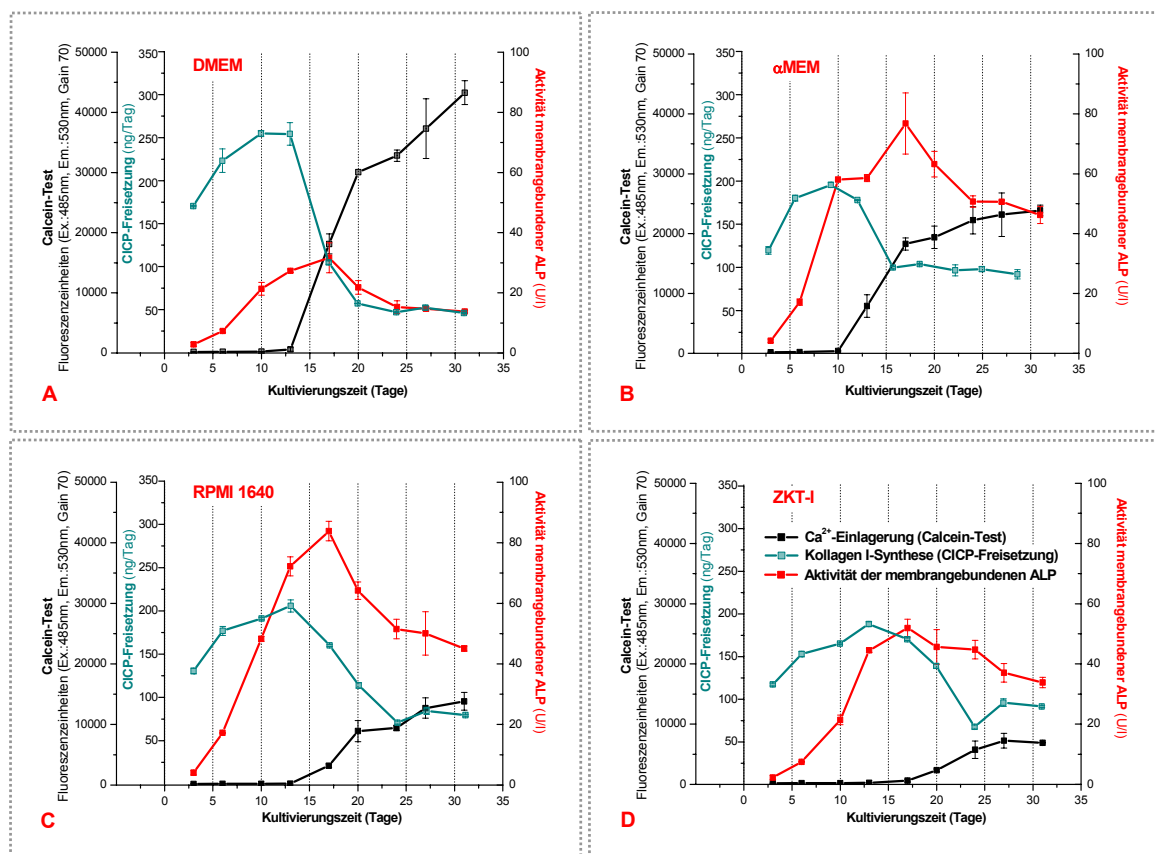
### **3.1.5 Bewertung der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und ECM-Mineralisierung in den vier getesteten Basalmedien**

Der Einsatz des einen oder anderen Basalmediums kann also Proliferation und Differenzierung humaner osteogener Zellen wesentlich beeinflussen. Offensichtlich kann keines der vier getesteten Medien eindeutig bevorzugt werden. Die Wahl des am besten geeigneten Nährmediums ist von den Zielsetzungen des jeweiligen Experiments bzw. von der konkreten Aufgabe des Knochen-Tissue-Engineerings abhängig. Es ist allerdings wichtig zu wissen, welchen Einfluss das gewählte Medium auf die knochenbildenden Zellen ausüben kann. In Abbildung 3.10 ist der komplette Verlauf der Differenzierung und in Tabelle 3.3 die Bewertung der Zellproliferation und -differenzierung in den vier getesteten Basalmedien während einer Langzeitkultivierung zusammenfassend dargestellt.

Um den vollständigen Differenzierungsprozess auch unter der Einwirkung verschiedener zusätzlichen Faktoren, wie z.B. Zytokinen, zu studieren, ist zweifellos  $\alpha$ MEM zu empfehlen. In diesem Medium verbinden sich gutes Wachstum, d.h. Aufrechterhaltung einer ausreichend großen Population an Progenitorzellen durch Vermeidung eines zu schnellen Ausdifferenzierens, mit kontrolliertem und ungestörtem Verlauf der Mineraleinlagerung.

Im weniger komplexen DMEM differenzieren die Knochenvorläuferzellen dagegen vergleichsweise schnell aus. Die zu einer umfangreichen Proliferation befähigten Osteoprogenitorzellen wechseln rasch in das nächste Entwicklungsstadium über, so dass in der Zellkultur relativ bald ein hoher Anteil an postmitotischen Osteoblasten und Osteozyten erreicht wird. Damit sind sowohl die verminderte Proliferation der Zellen als auch die hohe Intensität der Kollagen I-Synthese schon in der Anfangsphase der

Langzeitkultivierung zu erklären. Die vergleichsweise niedrige Aktivität der ALP in DMEM-Kulturen ist nicht eindeutig zu interpretieren. Die Expression dieses an dem Mineralisierungsprozess beteiligten Enzyms wird vielleicht durch die aus der Knochenmatrix kommenden Signale beeinflusst. Da die schon früh reichlich angelegte ECM als Promotor der Mineraleinlagerung wirkt [Boskey, 1996], ist für die Einleitung der Mineralisierung scheinbar auch eine geringere ALP-Aktivität ausreichend. Der schnelle Anstieg und der hohe Grad der Mineralisierung deuten jedoch darauf hin, dass in DMEM-Zellkulturen der eingeleitete Mineralisierungsprozess offensichtlich nicht einwandfrei erfolgt. Der Gehalt an nichtkollagenösen Proteinen ist am Tag 10 wahrscheinlich ausreichend, um den Mineralisierungsprozess zu initiieren, später jedoch erreicht er wegen des sehr schnellen Ausdifferenzierens der Vorläuferzellen womöglich nicht den Wert, der für einen kontrollierten Verlauf der Mineraleinlagerung benötigt wird.



**Abb. 3.10**

Kinetik der Kollagen I-Synthese (CICP-Freisetzung in den Kulturüberstand), Aktivität der membrangebundenen ALP und die Mineralisierung von ECM (Calcein-Test) während der Langzeitkultivierung humaner osteogener Zellen. Die Zellen wurden in drei häufig verwendeten Basalmedien – DMEM (A), αMEM (B), RPMI 1640 (C) sowie ZKT-I-Medium (D) kultiviert. Alle Medien wurden mit 10 % HS und osteogenen Supplementen angereichert.

Im Gegensatz zu DMEM und αMEM, verlangsamten RPMI 1640 und ZKT-I den Differenzierungsprozess osteogener Zellen. Diese verzögerte Differenzierung könnte sowohl durch den deutlich niedrigeren  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt in diesen Medien, aber auch durch andere Unterschiede in ihrer Zusammensetzung verursacht werden. Bei der Verwendung

von ZKT-I ist diese Verlangsamung stärker ausgeprägt, womit die geringere Intensität der Kollagen I-Synthese in der Anfangsphase der Langzeitkultivierung und die niedrigeren Werte der ALP-Aktivität zu erklären sind. In RPMI 1640 erfolgt der Reifungsprozess der Progenitorzellen etwas schneller; dementsprechend sind die Kollagen I-Synthese und die Werte der ALP-Aktivität etwas höher als bei der Kultivierung in ZKT-I. Da die Reaktionsgeschwindigkeit, d.h. die Geschwindigkeit der Mineraleinlagerung, von der Konzentration der Reaktionspartner abhängt, ist der etwas höhere Mineralisierungsgrad in RPMI 1640-Zellkulturen wahrscheinlich mit der deutlich höheren  $P_i$ -Konzentration im Kulturmedium verbunden.

Tabelle 3.3

**Bewertung der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und ECM-Mineralisierung in den vier getesteten Basalmedien während einer Langzeitkultivierung**

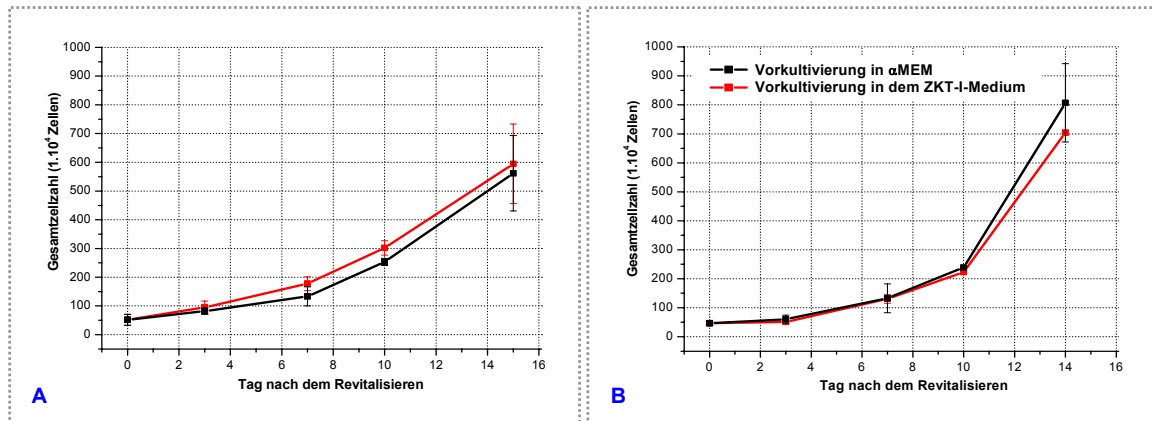
	DMEM	$\alpha$ MEM	RPMI 1640	ZKT-I
Proliferative Kapazität	++	++++	++++	+++
Differenzierungsgeschwindigkeit	++++	+++	++	+
Mineralisierungsgrad	++++	+++	++	+

Im Gegensatz zu osteogenen Ratten- und Kaninchenzellen ist ZKT-I-Medium in seiner ursprünglichen Zusammensetzung für eine postkonfluente Langzeitkultivierung humaner osteogener Zellen nur bedingt verwendbar. Im Kontext des Knochen-Tissue-Engineerings könnte es jedoch bei der Vermehrung humaner osteogener Zellen eingesetzt werden, um ein vorzeitiges Ausdifferenzieren der Knochenvorläuferzellen zu vermeiden und sie, z.B. bis zur Besiedlung eines Trägergerüsts, in einem möglichst frühen Entwicklungsstadium halten zu können (siehe 3.2).

### 3.2 Bestimmung des für die Vermehrung humaner osteogener Zellen optimalen Basalmediums

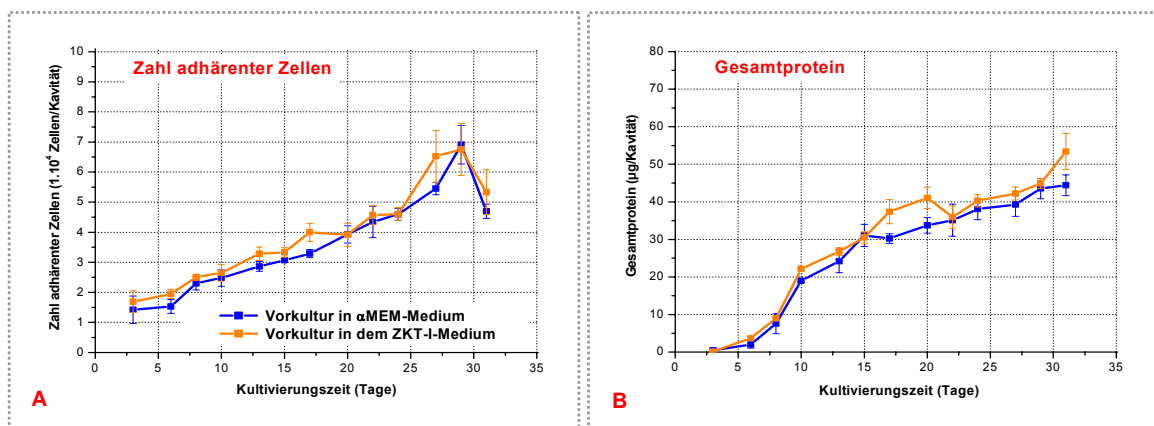
Zur Bestätigung der Annahme, dass ZKT-I-Medium während der Zellvermehrung den Erhalt einer größeren Anzahl an frühen Osteoprogenitoren sichert, wurden die aus einer heterotopen Ossifikation sowie die aus der Knochenspongiosa isolierten Zellen nach dem Revitalisieren über 4 Passagen entweder in mit 10 % HS und osteogenen Supplementen angereicherten  $\alpha$ MEM oder ZKT-I-Medium vermehrt. Dabei wurden die Zellen in T25- und T75-Flaschen kultiviert und immer in einem subkonfluenten Zustand passagiert. Die anfängliche Zelldichte in den Passagen schwankte im Bereich zwischen  $0,9 \cdot 10^4$  und  $1,2 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>. Beim Übergang in die 10. Passage wurden mit den Zellen, die aus der heterotopen Ossifikation gewonnen und in zwei unterschiedlichen Basalmedien vermehrt wurden, zwei Kulturansätze angelegt. Die Zellen aus jeder Vorkultur wurden in einer Dichte

von  $1,2 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> in Kavitäten von 48-Loch-Platten ausgesät und über einem Zeitraum von 31 Tagen nur noch in  $\alpha$ MEM, das ebenfalls 10 % HS und osteogene Supplemente enthält, unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) weiter kultiviert. In diesem Experiment wurde die Häufigkeit des Medienwechsels auf dreimal in der Woche erhöht und der Kulturüberstand für die biochemischen Untersuchungen immer 48 h nach diesem Vorgang entnommen.



**Abb. 3.11**

Zunahme der Gesamtzellzahl während der Vermehrung osteogener Zellen. Die aus einer heterotopener Ossifikation (A) oder aus Knochenspongiosa (B) isolierten osteogenen Zellen wurden nach dem Revitalisieren über 4 Passagen in  $\alpha$ MEM oder ZKT-I-Medium vermehrt. Beide Medien wurden mit 10 % HS und osteogenen Supplementen angereichert. Die Ermittlung der Gesamtzellzahl erfolgte beim Passagieren der Zellen. Die Kurven wurden mit Mittelwerten, die aus den Daten zweier unabhängiger Experimente gebildet wurden, aufgezeichnet.

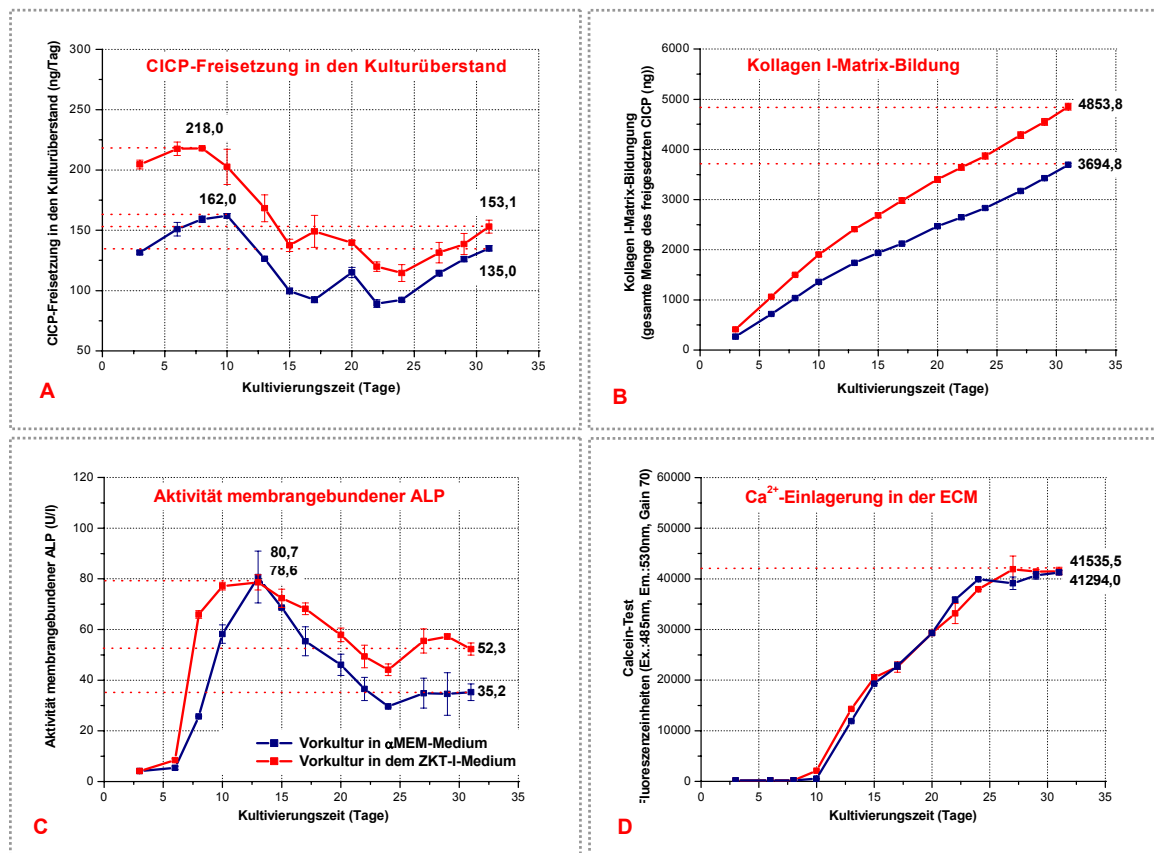


**Abb. 3.12**

Zunahme der Zahl adhärenter Zellen (indirekte Zellzahlbestimmung) (A) und des Gesamtproteins (B) während einer Langzeitkultivierung osteogener Zellen. Die aus einer heterotopener Ossifikation isolierten Zellen wurden nach dem Revitalisieren über 4 Passagen entweder in  $\alpha$ MEM oder in ZKT-I-Medium vermehrt. Beim Übergang in die 10. Passage wurden die Zellen in die Kavitäten einer 48-Loch-Platte ausgesät und über 31 Tage nur in  $\alpha$ MEM, das mit 10 % HS und osteogenen Supplementen angereichert wurde, weiter kultiviert.

Während der durchgeführten Vermehrung war zwischen dem Wachstum osteogener Zellen in  $\alpha$ MEM und in ZKT-I-Medium kein signifikanter Unterschied zu registrieren (Abb. 3.11). Im Laufe der nachfolgenden Langzeitkultivierung wiesen die verschieden vorkultivierten Zellen ebenfalls keine relevanten Differenzen in ihrer proliferativen Aktivität auf. Die Zunahme der

Zellzahl und des Gesamtproteins, d.h. die gesamte Menge an Progenitorzellen, die zu einer Vermehrung fähig sind, war in beiden Ansätzen nahezu gleich (Abb. 3.12).



**Abb. 3.13**

Differenzierung osteogener Zellen während einer Langzeitkultivierung. **A** - Kinetik der CACP-Freisetzung in den Kulturüberstand; **B** - die zu einem bestimmten Zeitpunkt insgesamt freigesetzte Menge an CACP, welche direkt proportional zu der Menge der gebildeten Kollagen I-Matrix ist; **C** - Aktivität der membrangebundenen ALP; **D** - Mineralisierung der ECM (Calcein-Test). Die aus einer heterotopen Ossifikation isolierten Zellen wurden nach dem Revitalisieren über 4 Passagen entweder in  $\alpha$ MEM oder in ZKT-I-Medium vermehrt. Beim Übergang in die 10. Passage wurden die Zellen in die Kavitäten einer 48-Loch-Platte ausgesät und über 31 Tage nur in  $\alpha$ MEM weiter kultiviert.

Der Verlauf der Differenzierung war jedoch unterschiedlich, was auf eine etwas andere Zusammensetzung der vorliegenden Kulturen hindeutete (Abb. 3.13). In Kulturen, die mit den in ZKT-I vermehrten osteogenen Zellen angelegt wurden, waren die Intensität der Kollagen I-Bildung und dadurch der gesamte Umfang der synthetisierten ECM eindeutig größer. In diesen Zellkulturen wurden auch ein etwas schnellerer Anstieg und ein langsamerer Abfall der ALP-Aktivität nachgewiesen. Der maximale Wert dieses Differenzierungsmarkers war dennoch fast gleich und wurde in beiden Ansätzen zum selben Zeitpunkt, nämlich am 13. Kultivierungstag, erreicht. Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass ZKT-I-Medium im Vergleich zu  $\alpha$ MEM die Differenzierung der Knochenvorläuferzellen verlangsamt und das Aufrechterhalten einer relativ hohen Anzahl von noch unreifen Osteoprogenitoren und womöglich MSC in der Kultur gewährleistet. Die Überführung der in ZKT-I-Medium vermehrten Zellen in  $\alpha$ MEM, das wegen seines höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts offensichtlich für die Differenzierung osteogener Zellen wesentlich besser



geeignet ist, verursacht deren beschleunigte Differenzierung und es wird eine sehr schnelle Zunahme der Kollagen I- und ALP-Bildung beobachtet. Die Kinetik der CICP-Freisetzung (Abb. 3.13A) deutet allerdings darauf hin, dass nach dem anfänglichen Entwicklungsschub ein Ausgleich der Differenzierungsgeschwindigkeit stattfindet. Etwa ab dem 10. Tag der Kultivierung ist sie in beiden Ansätzen fast identisch, d.h. die aufgezeichneten Kurven der CICP-Freisetzung verlaufen nahezu parallel und die Intensität der Matrix-Mineralisierung weist praktisch keine Unterschiede auf. Da die Zellkulturen, die mit den in ZKT-I-Medium vermehrten Zellen angelegt wurden, offensichtlich einen größeren Pool unreifer Progenitorzellen und möglicherweise auch MSC beherbergen, bleibt der Grad der Kollagen I- und ALP-Synthese in diesen bis zum Ende der Kultivierung höher und die Abnahme der ALP-Aktivität erfolgt eindeutig langsamer. Der wellenförmige Verlauf der Kurven von CICP-Freisetzung und ALP-Aktivität deutet darauf hin, dass auch am Ende der Kulturführung in beiden Ansätzen noch immer ein gewisser Anteil früher Knochenvorläuferzellen vorliegt. Ein synchronisiertes Ausreifen dieser Progenitoren, dessen Ursachen allerdings unklar bleiben, bewirkt einen wiederholten, jedoch deutlich geringeren Anstieg der Kollagen I-Synthese und ALP-Aktivität (Abb. 3.13A, 3.13C).

Bei einer In-vitro-Kultivierung humaner osteogener Zellen ist ein aufeinander folgender Einsatz zweier Basalmedien, d.h. erst eines Proliferationsmediums und danach eines Differenzierungsmediums sicher von Vorteil. Wenngleich das Proliferationsmedium, d.h. ZKT-I, kein eindeutig besseres Wachstum der osteogener Zellen im Laufe der Subkultivierung gewährleistet, so verlangsamt es doch den Differenzierungsprozess und begünstigt damit den Erhalt früher Progenitorzellen. Das Differenzierungsmedium  $\alpha$ MEM fördert dagegen das Ausdifferenzieren der Vorläuferzellen und erlaubt damit in einem In-vitro-Modellsystem den gesamten Prozess der Knochengewebsbildung zu untersuchen. Das Differenzierungsmedium  $\alpha$ MEM könnte womöglich auch durch ZKT-I mit einem erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt (z.B. 1,8 mmol/l) ersetzt werden.

Die Ergebnisse dieses Experiments legen ebenfalls dar, dass auch die Häufigkeit des Medienwechsels das Aufrechterhalten der Knochenvorläuferzellen begünstigt. Im Vergleich zum Höchstwert war z.B. die CICP-Freisetzungsrates bei einem nur zweimal in der Woche vorgenommenen Medienwechsel am Ende der Langzeitkultivierung um 52,9 % (Abb. 3.2B), bei einem dreimal in der Woche vorgenommenen Medienwechsel nur noch um 29,8 % (Abb. 3.13A, rote Linie) niedriger. Der größere Anteil an Progenitorzellen in der Kultur ist bei einem dreimal in der Woche vorgenommenen Medienwechsel wahrscheinlich einerseits mit der öfter erfolgten Zufuhr von Nährstoffen, Aminosäuren und Vitaminen und andererseits mit dem häufigerem Eliminieren von in den Kulturüberstand abgesonderten, den Differenzierungsprozess fördernden Zytokinen verbunden. Die mit einer höheren Frequenz durchgeführten biochemischen Untersuchungen ermöglichten gleichzeitig eine deutlich bessere Überwachung des Verlaufs der osteogenen Differenzierung.

### **3.3 Vergleich der Kultivierung humaner osteogener Zellen in mit FBS oder Humanserum angereicherten Medien**

Osteogene Zellen werden am häufigsten in einem mit 10 % Serum angereicherten Medium kultiviert. Serum stellt eine Quelle von Zytokinen, Hormonen, Proteinen der Zelladhäsion, Spurelementen, Mineral- und Nährstoffen dar, welche für ein normales Wachstum, die ungestörte Differenzierung und Funktion osteogener Zellen unerlässlich sind [McAlinden & Wilson, 2000; Hankey et al., 2001; Schecroun & Delloye, 2004]. In den meisten Fällen wird das Serum vor dem Einsatz komplementinaktiviert, d.h. 30 min bei 56 °C erwärmt. Es wird weitgehend angenommen, dass die Konzentration der Wachstums- und Differenzierungsfaktoren davon kaum beeinflusst wird [Hankey et al., 2001; Bruinink et al., 2004].

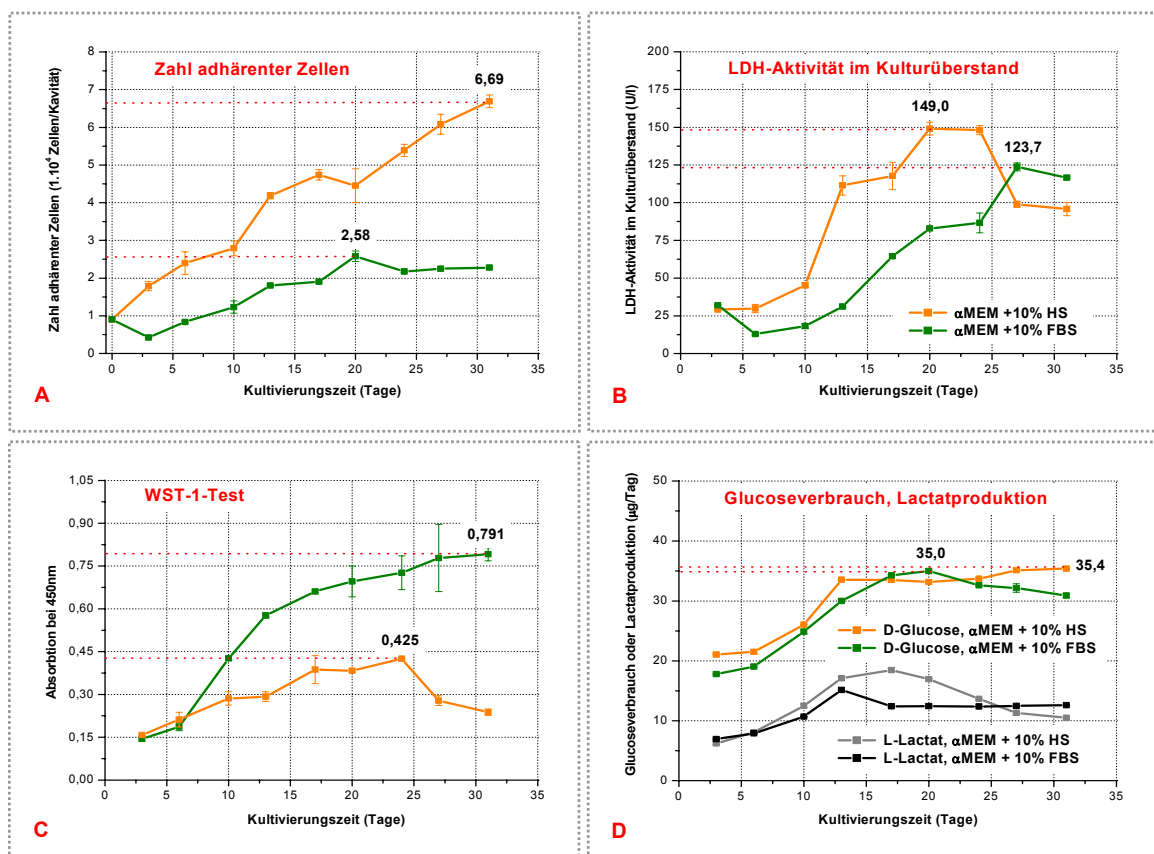
Das leicht zugängliche und relativ preiswerte FBS wird bei der Erforschung osteogener Zellen, auch humaner Herkunft, am häufigsten eingesetzt. Die Verwendung dieses nicht spezies-spezifischen Serums ist bei einer In-vitro-Kultivierung humaner Zellen immer mit einem stark erhöhten Risiko verbunden, durch Viren oder Prionen ausgelöste Krankheiten zu übertragen oder die Kultur mit spezies-fremden Proteinen zu kontaminieren. In diesem Kontext muss der Kontakt humaner Zellen mit FBS entweder vermieden oder möglichst reduziert werden, insbesondere in den Fällen, wo diese für eine spätere Implantation benutzt werden sollen [Anselme et al., 2002; Minuth et al., 2003]. Seit einigen Jahren wird daher versucht FBS durch autologes oder allogenes humanes Serum (HS) bzw. Plasma zu ersetzen und die Vorteile einer solchen Kultivierung gegenüber der Kultivierung in FBS-haltigen Medien zu ergründen [Koller et al., 1998; Oreffo et al., 1998; Kuznetsov et al., 2000; McAlinden & Wilson, 2000; Hankey et al., 2001; Yamamoto et al., 2003; Bruinink et al., 2004; Schecroun & Delloye, 2004]. Die Ergebnisse dieser Studien sind noch oft widersprüchlich, was wahrscheinlich mit der Verwendung verschiedener Seren zu erklären ist. Es ist allgemein bekannt, dass die Zusammensetzung der Seren aus unterschiedlichen Chargen oder von verschiedenen Patienten erheblich voneinander abweichen kann.

Das Präzisieren und Analysieren der Unterschiede, welche bei der Verwendung von FBS- und HS-haltigen Medien auftreten, insbesondere bei einer Langzeitkultivierung humaner osteogener Zellen, war eine der Zielsetzungen auch dieser Arbeit.

#### **3.3.1 Vergleich der Zellproliferation und -differenzierung in mit FBS oder Humanserum angereicherten Medien**

Für die Ermittlung der Proliferation und Differenzierung osteogener Zellen während der Kultivierung in einem mit HS oder FBS angereicherten Medium wurden die aus einer heterotopen Ossifikation isolierten Zellen in der 6. Passage revitalisiert und zuerst über 3 Passagen in ZKT-I-Medium mit 10 % HS und osteogenen Supplementen vermehrt. Um die Zellen an ein anders supplementiertes Nährmedium zu gewöhnen, wurden diese während der 9. Passage in  $\alpha$ MEM, das ebenfalls mit osteogenen Supplementen und

10 % FBS oder 10 % HS angereichert war, weiterkultiviert. Beim Übergang in die 10. Passage wurden die Zellen aus jeder Vorkultur im entsprechenden Medium in einer Dichte von  $1,2 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>, d.h. 9000 Zellen pro Kavität, in 48-Loch-Platten, T25- und T75-Flaschen, die vorher mit 1%iger Gelatine beschichtet wurden, ausgesät und anschließend über einen Zeitraum von 31 Tagen unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) kultiviert. Medienwechsel und die analytischen Untersuchungen für die Bestimmung von Proliferation, Vitalität und Differenzierung osteogener Zellen wurden zweimal pro Woche durchgeführt. Die Entnahme von Kulturüberstand für die benötigten biochemischen Analysen fand dabei immer 72 h nach dem Medienwechsel statt.



**Abb. 3.14**

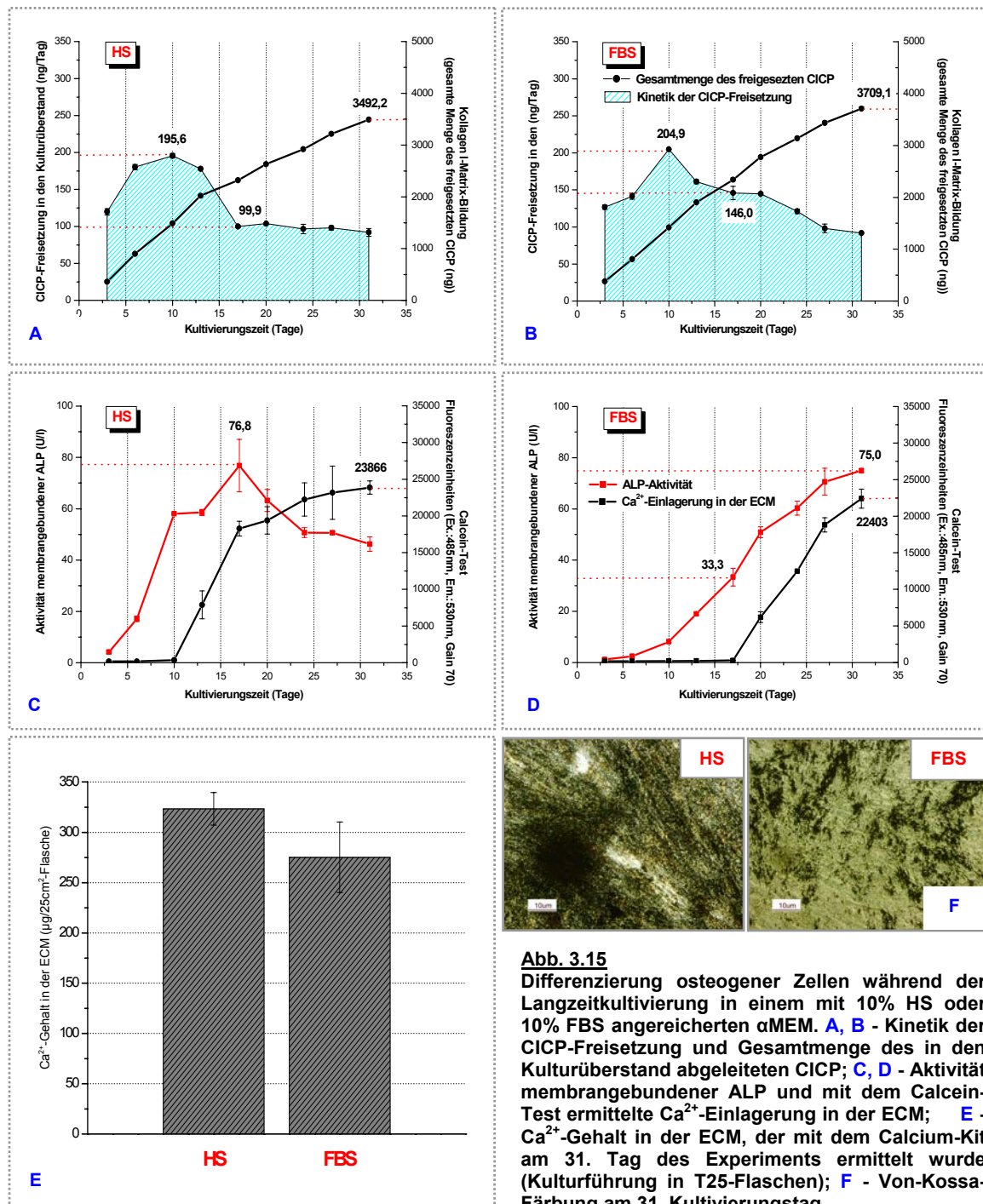
Proliferation und Vitalität osteogener Zellen während der Langzeitkultivierung in mit osteogenen Supplementen und 10 % HS oder 10 % FBS angereichertem αMEM. **A** - Zahl adhärenter Zellen (indirekte Zellzahlbestimmung); **B** - LDH-Aktivität im Kulturüberstand; **C** - WST-1-Test ; **D** - Glucoseverbrauch und Lactatproduktion.

Die Abbildung 3.14 stellt die Veränderungen in der proliferativen und metabolischen Aktivität osteogener Zellen während der durchgeführten Langzeitkultivierung dar. Die Proliferation der Zellen in dem mit 10 % HS supplementierten αMEM war, wie in Abbildung 3.14A zu sehen, eindeutig besser, d.h. in diesen Zellkulturen wurde über den ganzen Zeitraum des Experiments eine kontinuierliche Zunahme der Zahl adhärenter Zellen festgestellt. Der maximale Wert der indirekt, d.h. über die Gesamt-DNA, bestimmten Zellzahl war in HS-Kulturen 2,6-mal höher als in den FBS-Kulturen. In Letzteren wurde die

größte Zelldichte schon am 20. Kultivierungstag erreicht; danach fand kein weiteres Zellwachstum statt und die Zahl der adhärenenten Zellen blieb bis zum Ende der Kultivierung praktisch unverändert. Zudem konnte das FBS-haltige Medium auch keine adäquate Adhäsion der Zellen gewährleisten. So entsprach z.B. die mittlere Zelldichte in FBS-Zellkulturen am 3. Kultivierungstag 4250 Zellen pro Kavität und damit war um mehr als die Hälfte niedriger als beim Ausplattieren der Zellen. Offensichtlich haftete ein erheblicher Anteil der ausgesäten Zellen an der Plastikoberfläche der Zellkulturplatten überhaupt nicht oder nur sehr schlecht an und wurde dadurch beim nächsten Medienwechsel aus der Kultur entweder entfernt oder starb schon vorher ab. Diese Annahme bestätigt auch der Abfall der LDH-Aktivität, der nach dem ersten durchgeführten Medienwechsel im Kulturüberstand von FBS-Kulturen beobachtet wurde (siehe Abb. 3.14B).

Es ist interessant, dass die Kulturen, die im FBS-haltigen Medium kultiviert wurden, bei einer viel niedrigeren Zellzahl einen vergleichbar hohen Glucoseverbrauch, eine ähnlich starke Lactatproduktion sowie eine fast zweimal höhere Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen (höheren Umsatz des WST-1-Reagenz) aufwiesen (Abb. 3.14C, 3.14D). Die Ursachen des erhöhten energetischen Bedarfs der humanen osteogenen Zellen bei der Verwendung eines FBS-haltigen Mediums konnten in diesem Experiment allerdings nicht geklärt werden. Der Metabolismus knochenbildender Zellen ist bis jetzt sehr wenig erforscht. Die Ergebnisse des durchgeführten Langzeitexperiments deuten allerdings darauf hin, dass eine fortschreitende osteogene Differenzierung auch mit Umstellungen im metabolischen Status der Zellen verbunden ist, und stimmen damit mit den von Komarova et al. [2000] veröffentlichten Angaben überein. So wurde z.B. in den HS-Kulturen nach dem 13. Kultivierungstag nur eine sehr geringe Zunahme des Glucosekonsums und nach dem 24. Kultivierungstag ein starker Abfall der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen registriert, obwohl die Erhöhung der Zellzahl noch bis zum Schluss des Experiments erfolgte. Diese Veränderungen deuten wahrscheinlich auf eine Erhöhung des Anteils metabolisch viel inaktiverer Osteozyten oder Bone Lining Cells hin. Die ermittelten Daten bieten jedenfalls einen interessanten Ansatz für weitergehende experimentelle Fragestellungen und zeigen, dass eine direkte Korrelation der Zellzahl mit den Werten des Glucoseverbrauchs, der Lactatproduktion und des WST-1-Tests bei einer Langzeitkultivierung osteogener Zellen nur sehr begrenzt möglich ist.

Die Analyse des Differenzierungsprozesses zeigte ferner, dass bei der Kultivierung in einem mit 10 % FBS angereicherten Medium neben der Adhäsion und dem Wachstum auch die Reifung der Knochenvorläuferzellen deutlich gehemmt wird (Abb. 3.15). So wurde in FBS-Kulturen ein viel langsamerer Anstieg und Abfall der Intensität der Kollagen I-Synthese registriert, was auf einen verzögerten Übergang der Vorläuferzellen zunächst in das Stadium reifer Osteoblasten und dann in das der Osteozyten hindeutete (Abb. 3.15A, B).

**Abb. 3.15**

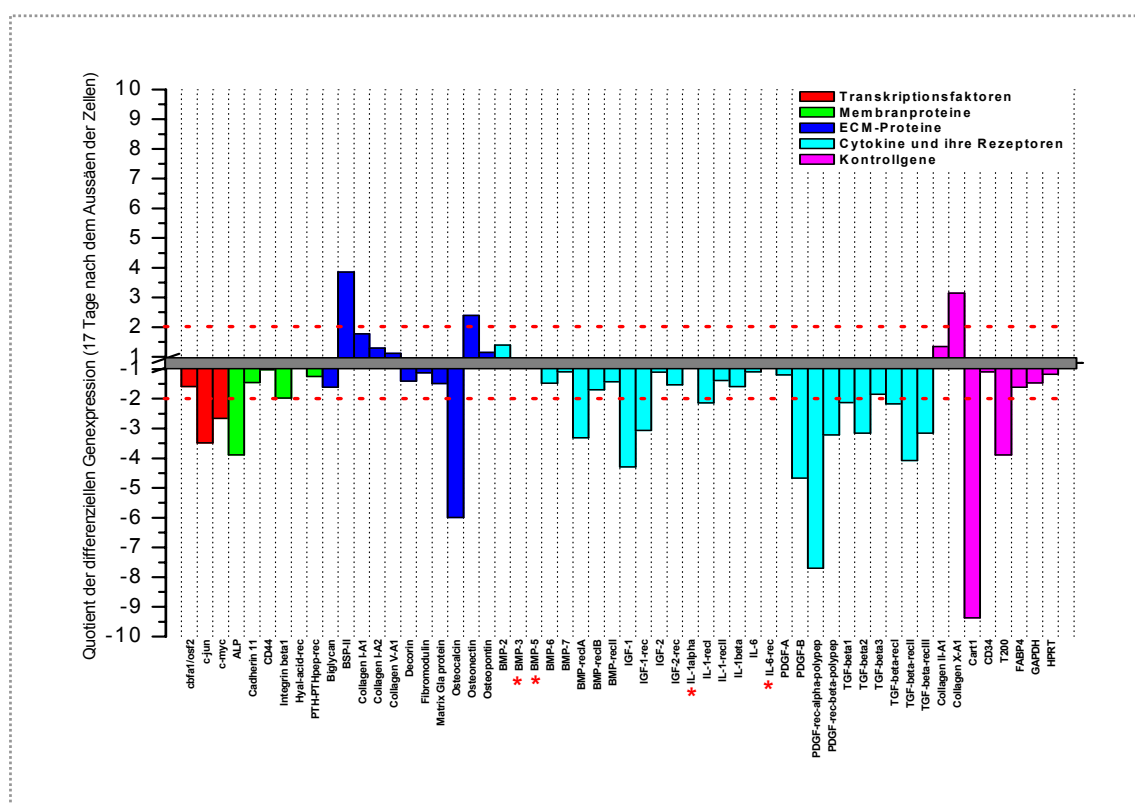
Differenzierung osteogener Zellen während der Langzeitkultivierung in einem mit 10% HS oder 10% FBS angereicherten  $\alpha$ MEM. **A, B** - Kinetik der CIP-Freisetzung und Gesamtmenge des in den Kulturüberstand abgeleiteten CIP; **C, D** - Aktivität membrangebundener ALP und mit dem Calcein-Test ermittelte Ca<sup>2+</sup>-Einlagerung in der ECM; **E** - Ca<sup>2+</sup>-Gehalt in der ECM, der mit dem Calcium-Kit am 31. Tag des Experiments ermittelt wurde (Kulturführung in T25-Flaschen); **F** - Von-Kossa-Färbung am 31. Kultivierungstag.

Diese Hypothese wurde zudem durch die deutlich langsamere Zunahme der ALP-Aktivität und die Vergrößerung des Zeitraums, der als „osteoid maturation period“ oder „mineralization lag time“ bezeichnet wird, bestätigt (Abb. 3.15C, D). Dieser war bei den HS-Kulturen 10 Tage, bei den FBS-Kulturen dagegen 17 Tage lang. Wegen der Verlangsamung des Differenzierungsprozesses war am Schluss der Kultivierung der Gesamtumfang der angelegten ECM (die Gesamtmenge des im Kulturüberstand freigesetzten CIP) in FBS-Kulturen sogar um 6,2 % höher. Auch der registrierte Maximalwert der ALP-Aktivität und der erreichte Grad der Mineralisierung (Abb. 3.15C, D,

E, F) wiesen in beiden getesteten Zellkulturen am Ende der Langzeitkultivierung nur geringe Unterschiede auf, wobei der Höhepunkt der ALP-Aktivität in den FBS-Kulturen ganze 14 Tage später erzielt wurde.

### 3.3.2 Vergleich des Genexpressionsprofils bei der Kultivierung humaner osteogener Zellen in mit FBS oder Humanserum angereicherten Medien

Neben einem Vergleich von Zellproliferation und Differenzierung wurde auch eine Microarray-Analyse der differentiellen Genexpression durchgeführt. Bei der cDNA-Synthese wurde die aus den FBS-Kulturen gewonnene RNA als Analyse, die aus den HS-Kulturen gewonnene RNA als Referenz definiert. Die berechneten Quotienten zeigen damit eine Zunahme oder Abnahme des Expressionsgrads untersuchter Gene bei der Kultivierung in FBS-haltigem Medium auf. Die RNA aus beiden Ansätzen wurde zum selben Zeitpunkt isoliert, d.h. am 17. Tag der Langzeitkultivierung. Wie aus Abbildung 3.16 und Tabelle 3.4 ersichtlich ist, induzierte die Kultivierung in mit FBS supplementiertem  $\alpha$ MEM statistisch relevante Veränderungen im Expressionsgrad von 22 untersuchten Genen, wobei die Expression der meisten von ihnen reduziert wurde.



**Abb. 3.16**

Ergebnisse einer Microarray-Analyse der differentiellen Genexpression. Die aus einer heterotopen Ossifikation isolierten osteogenen Zellen wurden entweder in mit osteogenen Supplementen und 10 % FBS oder in mit osteogenen Supplementen und 10 % HS angereichertem  $\alpha$ MEM kultiviert. Die in FBS-haltigem Medium kultivierten Zellen wurden beim durchgeführten Microarray-Experiment als Analyse, die in HS-haltigem Medium kultivierten Zellen als Referenz definiert. Die rot punktierte Linie kennzeichnet die Signifikanzgrenze der differentiellen Genexpression; \* - Gene, deren Expression bei einer Kultivierung in FBS-haltigem Medium nicht registriert werden konnte. Die Gesamt-RNA für die Microarray-Analyse wurde aus jeweils einer Flaschenkultur (T75-Kulturflasche) am 17. Tag des Experiments isoliert.

**Tabelle 3.4**

**Statistisch relevante Unterschiede in der Expression untersuchter Gene bei der Kultivierung humaner osteogener Zellen in einem mit 10 % FBS angereicherten  $\alpha$ MEM im Vergleich zur Kultivierung in einem mit Humanserum angereicherten  $\alpha$ MEM**

Nr.	Name des Gens in der NCBI-Datenbank und benutzte Abkürzung	Gennummer	Quotient
<b>Transkriptionsfaktoren</b>			
1.	<b>c-jun</b> proto oncogene	J04111	<b>-3,49</b>
2.	<b>c-myc</b> transcription factor	L16785	<b>-2,66</b>
<b>Membranproteine</b>			
3.	<b>Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney (ALP)</b>	XM_001826	<b>-3,89</b>
<b>ECM-Proteine</b>			
5.	<b>Integrin-binding sialoprotein (bone sialoprotein, bone sialoprotein II) (BSP-II)</b>	XM_032432	<b>+3,85</b>
6.	<b>Bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein (Osteocalcin)</b>	XM_002069	<b>-5,99</b>
7.	<b>Secreted protein, acidic, cysteine-rich (Osteonectin)</b>	XM_032759	<b>+2,39</b>
<b>Wachstums-, Differenzierungsfaktoren und ihre Rezeptoren</b>			
8.	<b>Bone morphogenetic protein receptor, type IA (BMP-recIA)</b>	XM_015818	<b>-3,31</b>
9.	<b>Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C) (IGF-1)</b>	XM_052648	<b>-4,29</b>
10.	<b>Insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1-rec)</b>	XM_031026	<b>-3,06</b>
11.	<b>Interleukin 1 receptor, type I (IL-1-recl)</b>	XM_038734	<b>-2,14</b>
12.	<b>Platelet-derived growth factor B chain (PDGF-B)</b>	X02811	<b>-4,67</b>
13.	<b>Platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide (PDGF-rec-alpha-polypep)</b>	XM_032213	<b>-7,70</b>
14.	<b>Platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide (PDGF-rec-beta-polypep)</b>	XM_015815	<b>-3,22</b>
15.	<b>Transforming growth factor, beta 1 (TGF-beta1)</b>	XM_030906	<b>-2,13</b>
16.	<b>Transforming growth factor, beta 2 (TGF-beta2)</b>	XM_001754	<b>-3,16</b>
17.	<b>Transforming growth factor, beta receptor I (TGF-beta-recl)</b>	XM_005591	<b>-2,17</b>
18.	<b>Transforming growth factor, beta receptor II (TGF-beta-recII)</b>	XM_003094	<b>-4,08</b>
19.	<b>Transforming growth factor, beta receptor III (betaglycan) (TGF-beta-recIII)</b>	XM_001924	<b>-3,16</b>
<b>Kontrollgene</b>			
20.	<b>Collagen, type X, alpha 1 (Collagen X-A1)</b>	XM_018467	<b>+3,15</b>
21.	<b>Cartilage paired-class homeoprotein 1 (Cart1)</b>	NM_006982	<b>-9,37</b>
22.	<b>Leukocyte common antigen (T200, CD45) (T200)</b>	Y00638	<b>-3,89</b>

In der Gruppe der Transkriptionsfaktoren wurde eine verringerte Intensität der c-Jun- und c-Myc-Expression festgestellt. Wie schon erwähnt (siehe 1.2.2.1), verschlüsseln diese Proto-Onkogene die homonymen Transkriptionsfaktoren, welche wiederum die Expression der im Zellzyklus und im Differenzierungsprozess beteiligten Gene regulieren. C-Myc ist z.B. ein äußerst potenter Regulator des Zellzyklus. In mehreren Regulationsschritten aktiviert er die Cyclin D- und Cyclin E-abhängigen Kinasen und inaktiviert das Tumorsuppressorprotein Rb. Damit wird der Eintritt der Zellen in die S-Phase des Zyklus gefördert [Schlosser, 2003]. C-Jun ist an der Ausbildung des AP-1-Komplexes beteiligt, der den Verlauf eines breiten Spektrums verschiedener biologischer Prozesse, einschließlich

Wachstum, Differenzierung, Apoptose und auch die onkogene Transformation der Zellen kontrolliert [Wagner, 2002]. Entsprechend der Literaturangaben wird die Zunahme der Expression beider Onkogene schon in der proliferativen Phase der Osteogenese und auch als Antwort auf die Einwirkung verschiedener Zytokine beobachtet [Stein et al., 1996; Aubin & Liu, 1996; Aubin, 2000]. Die geringere Expression von c-Jun und c-Myc korrelierte im konkreten Fall offenbar mit der viel geringeren proliferativen Aktivität osteogener Zellen während der Kultivierung in dem mit FBS angereicherten Medium (siehe Abb. 3.14A).

In den Gruppen der Membran- und ECM-Proteine war die Genexpression der membrangebundenen ALP und des Osteocalcins signifikant verringert. Die Transkription der Gene von Knochen-Sialoprotein und Osteonectin war im Gegensatz dazu erhöht. Die gewonnenen Informationen vervollständigten und bestätigten damit die Daten, die mit den biochemischen Analysemethoden auf der Ebene der Proteinsynthese gewonnen wurden.

So war in FBS-Kulturen im Vergleich zu HS-Kulturen am 17. Kultivierungstag eine 3,89-mal geringere Expression des ALP-Gens und auf der Proteinebene eine 2,31-mal geringere Aktivität dieses membrangebundenen Enzyms nachweisbar. Ein erhöhter Expressionsgrad von Knochen-Sialoprotein und Osteonectin wird kurz vor dem Anfang der Mineraleinlagerung beobachtet, wobei die beiden nichtkollagenösen Proteine sowohl als Nukleatoren als auch als Regulatoren der Matrix-Mineralisierung fungieren [Boskey, 1998; Boskey & Paschalis, 2000; Aubin, 2000]. Bei den FBS-Kulturen stimmte der Zeitpunkt der RNA-Isolierung (17. Kultivierungstag) eindeutig mit der Initiierungsphase der Mineraleinlagerung überein; bei den HS-Kulturen war der Mineralisierungsprozess zu diesem Zeitpunkt schon stark fortgeschritten und die Expression der Gene für Knochen-Sialoprotein und Osteonectin anscheinend wieder verringert (siehe Abb. 3.15C, D). Dies erklärt auch die viel niedrigere Transkription des Osteocalcin-Gens (Quotient = -5,99) in FBS-Kulturen im Vergleich zu HS-Kulturen. Osteocalcin besitzt eine hohe Affinität gegenüber Calcium und ist daher an der Regulation des Wachstums von Hydroxylapatit-Kristallen beteiligt. Von Osteoblasten wird es am stärksten in der Phase einer zunehmenden Matrix-Mineralisierung synthetisiert [Stein et al., 1996; Aubin, 2000].

Auch die Quotienten der differenziellen Genexpression, die unter der Reproduzierbarkeitsgrenze eines Microarray-Experiments liegen, können zusätzliche Informationen über die Transkription des Gens liefern, wenn eine Möglichkeit besteht, die Intensitäten der Genexpression und der Proteinsynthese direkt zu vergleichen. So war z.B. die Intensität der Kollagen I-Synthese in FBS-Kulturen am 17. Tag der Langzeitkultivierung, wie die Bestimmung der CICP-Freisetzung zeigte, um den Faktor 1,46 höher als in den HS-Kulturen (siehe Abb. 3.15A, B). Auf der Genexpressionsebene wurde eine 1,77- und 1,29-mal höhere Transkription der für die Kollagen I-Synthese zuständigen Gene Collagen I-A1 und Collagen I-A2 ermittelt. Damit korrelierten die Quotienten der Genexpression sehr gut mit dem auf der Ebene der Proteinexpression ermittelten Werten.



Die Verwendung eines FBS-haltigen Mediums beeinflusste jedoch am stärksten die Transkription von Genen, die für die Synthese von Zytokinen oder deren Rezeptoren zuständig sind. Die Expression fast aller untersuchten Gene wurde, wie in Abbildung 3.16 dargestellt, reduziert. Eine statistisch relevante Abnahme des Expressionsgrads konnte allerdings nur bei 12 von 28 Genen dieser Gruppe nachgewiesen werden (Tab. 3.4). In FBS-Kulturen wurde z.B. eine deutlich geringere Transkription der Gene, die IGF-1 und PDGF-B kodieren, registriert. Beide Wachstumsfaktoren besitzen ein starkes mitogenes Potential [Heldin et al., 1998; Szczesny, 2002; Cornish et al., 2004]. Die Abnahme der Transkription der genannten Wachstumsfaktoren korrelierte mit geringerer Expression von Genen, die für die Synthese der entsprechenden Rezeptoren zuständig sind. So exprimierten die osteogenen Zellen der FBS-Kulturen das Gen des IGF-1-Rezeptors (von den beiden bis jetzt bekannten Typen der IGF-Rezeptoren ist nur der Typ-I-Rezeptor an der Signalübertragung in das Zellinnere beteiligt) und die beiden Gene, die die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren von PDGF verschlüsseln, deutlich schwächer. In den FBS-Zellkulturen wurde ebenfalls eine geringere Genexpression von TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und allen drei TGF- $\beta$ -Rezeptoren beobachtet. Diese Wachstumsfaktoren wirken als Modulatoren der Zellproliferation und Differenzierung. Der niedrigere Grad der Expression von Zytokinen ist wahrscheinlich mit der Differenzierungsverzögerung osteogener Zellen bei der Kultivierung in einem FBS-haltigen Medium und einem dementsprechend höheren Anteil von synthetisch weniger aktiven Progenitorzellen in diesen Zellkulturen verbunden. Jedenfalls korrelierte die Reduzierung der Expression erwähnter Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren mit einem deutlich schwächeren Zellwachstum, was auf eine autokrine Regulation der Zellproliferation hindeutet.

Die Microarray-Analyse der Genexpression zeigte ebenfalls, dass in beiden getesteten Zellkulturen auch noch am 17. Tag des Experiments „fremde“ d.h. nicht osteogene Zelltypen (Chondrozyten, Adipozyten, hämatopoetische Zellen und womöglich Fibroblasten) vorliegen, wobei bei der Kultivierung in einem mit FBS angereicherten Medium deren Anteil etwas niedriger war. Es wurde z.B. eine signifikant geringere Expression von Genen, die Cart-1 und T-200 kodieren, ermittelt. Cart-1 (cartilage paired-class homeoprotein 1) ist ein Transkriptionsfaktor, der vorwiegend in chondrogenen Progenitorzellen exprimiert wird und die Entwicklung der MSC in die chondrogene Richtung bestimmt [Zhao et al., 1993]. Eine reduzierte Expression dieses Gens deutet offensichtlich auf eine niedrigere Quote chondrogener Vorläuferzellen in den FBS-Kulturen hin. In diesen wurde dagegen das Gen von Kollagen X signifikant stärker transkribiert. Dieses nicht fibrilläre Kollagen wird ausschließlich von reifen, d.h. hypertrophen Chondrozyten synthetisiert [Rossert & Crombrughe, 1996; Robey, 1996]. Das bedeutet, dass FBS möglicherweise Substanzen enthält, die eine chondrogene Differenzierung stimulieren und eine osteogene hemmen. Humanserum wiederum hindert die Differenzierung der

Chondroprogenitoren und fördert gleichzeitig die der osteogenen Vorläuferzellen. Diese Hypothese müsste jedoch von weiteren, zielgerichteten Experimenten bestätigt werden. Antigen T200 (CD45), das in FBS-Kulturen ebenfalls signifikant niedriger exprimiert wurde, ist auf der Oberfläche determinierter hämatopoetischer Vorläuferzellen und reifer Zellen hämatopoetischer Abstammung vorzufinden. Eine Ausnahme bilden jedoch Thrombozyten, Erythrozyten und deren Vorläuferzellen. Diese Daten lassen vermuten, dass die Verwendung eines mit FBS supplementierten Mediums das Überleben und die Differenzierung auch von hämatopoetischen Stammzellen hemmt.

### **3.3.3 Bewertung der Kultivierung humaner osteogener Zellen in einem mit FBS angereicherten Medium**

Im Gegensatz zur Kultivierung in einem mit Humanserum (HS) angereicherten Medium führt ein FBS-haltiges Medium, wie die Ergebnisse des durchgeführten Langzeitexperiments beweisen, zu geringerer Adhäsion, schwächerem Wachstum und verzögerter Differenzierung humaner Knochenvorläuferzellen. Gleichzeitig weisen die mit FBS kultivierten Zellen eine erhöhte metabolische Aktivität auf. Analoge Daten wurden auch von einer Reihe der Autoren veröffentlicht, die aus humanem Knochenmark oder Knochenspongiosa isolierte Zellen parallel in einem mit 10 % FBS und in einem mit 10 % HS supplementierten Medium kultiviert haben [Oreffo et al., 1997; Hankey et al., 2001; McAlinden & Wilson, 2000; Schecroun & Delloye, 2004].

Serum stellt, wie schon erwähnt, eine sehr komplexe und heterogene Mischung aus Zytokinen, Hormonen, Transportproteinen, Lipiden, Elektrolyten, Stoffwechselprodukten und anderen, teilweise noch nicht identifizierten Substanzen dar. Die Anzahl der im Serum enthaltenen Stoffe wird auf ca. 5000 geschätzt [Minuth et al., 2003]. Deswegen können die genauen Ursachen der beobachteten Defizite bei der Kultivierung adulter osteogener Humanzellen in einem mit FBS supplementierten Medium nur sehr schwer aufgedeckt werden. Womöglich liegen sie in fehlenden humanenspezifischen Eigenschaften der im FBS enthaltenen Spreading-, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren oder in der Tatsache, dass die Zellen eines erwachsenen Organismus mit dem aus einem Fötus gewonnenen Serum in Kontakt kommen. Immerhin können die Seren auch Substanzen enthalten, die Zellwachstum und -differenzierung hemmen. Es ist ebenfalls nicht ausgeschlossen, dass im adulten HS die für das Wachstum und die Differenzierung humaner Zellen erforderlichen Substanzen in einer physiologisch adäquateren Konzentration vorliegen [Hankey et al., 2001].

Oreffo et al. [1997] haben bei der Kultivierung humaner, aus der Knochenspongiosa isolierter Zellen in einem mit 10 % HS und mit 10 nm Dexamethason angereicherten  $\alpha$ MEM eine erhöhte Intensität der Adipogenese beobachtet. In dem konkreten, unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführten Experiment konnte dieses Ergebnis allerdings nicht bestätigt werden. Die Expression des FABP4 (fatty acid binding protein 4)-Gens, die

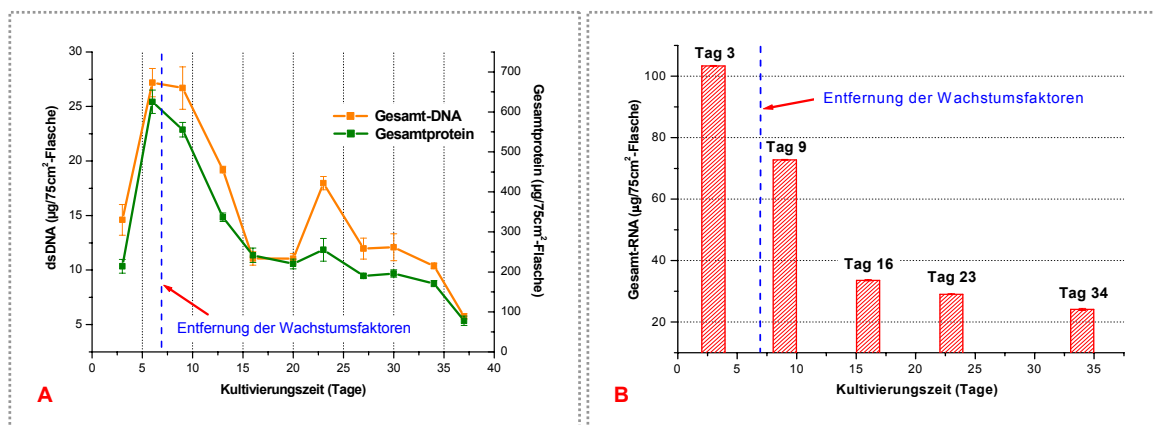
eine fortschreitende adipogene Differenzierung charakterisiert [Sen et al., 2001], war in beiden untersuchten Zellkulturen nicht signifikant unterschiedlich.

### **3.4 Entwicklung eines für die Kultivierung humaner osteogener Zellen geeigneten serumreduzierten Mediums**

Die Entwicklung eines für die Kultivierung humaner osteogener Zellen geeigneten serumreduzierten Mediums war eine der Zielsetzungen vorliegender Arbeit. Der Einsatz von Seren aus verschiedenen Chargen kann die Kultivierungsbedingungen und damit die Proliferation und Differenzierung osteogener Zellen stark beeinflussen, da qualitative und quantitative Unterschiede zwischen Seren, die von verschiedenen Patienten oder Chargen stammen, praktisch unvermeidbar sind. Serum stellt somit eine kaum zu definierende Komponente des Mediums dar. Bei einem serumreduzierten Ansatz hingegen fielen Unterschiede zwischen Medien, die mit Seren aus verschiedenen Chargen supplementiert wurden, weniger ins Gewicht. Außerdem kann ein hoher Serumgehalt die Genauigkeit analytischer Bestimmungen verringern und damit die Überwachung von Zellkulturen beeinträchtigen. Dies geschieht meist dann, wenn die Konzentration des interessierenden Analyts im verwendeten Serum und damit bereits schon im Nährmedium hoch ist. Weitere wichtige Gründe für eine serumreduzierte Zellkultivierung sind das schon erwähnte Infektionsrisiko, besonders bei der Verwendung allogener Seren, und der Kostenfaktor. Humanes Serum ist nicht nur viel schwerer zugänglich, sondern auch deutlich teurer als FBS. Die Gewinnung größerer Mengen autologen Serums stellt außerdem eine zusätzliche Belastung für den Patienten dar. Auch aus diesen Gründen ist eine Reduzierung des Serumgehalts auf 1-2 % sehr vorteilhaft. Allerdings wird dadurch im Kulturmedium auch der Gehalt an Substanzen, die Wachstum, Adhäsion und Differenzierung der Zellen fördern, erheblich verringert. Zellen, besonders primäre Zellen, reagieren sehr empfindlich auf einen abrupten Wandel des extrazellulären Milieus, der mit einer Reduzierung des Serumgehalts einhergeht. Oft vermindern sie ihre Proliferation oder stellen sie ganz ein. Deswegen muss im Kulturmedium vor allem die Konzentration von Substanzen, die das Zellwachstum stimulieren, nachträglich erhöht werden. Neben Insulin, Transferrin und Albumin (Insulin + Transferrin + Albumin (ITA)) werden in die serumfreien und serumreduzierten Kulturmedien auch Wachstumsfaktoren, z.B. PDGF-BB, FGF-2, EGF, IGF-I, TGF- $\beta$ 1 extra zugegeben [Gronthos & Simmons, 1995; Kuznetsov et al., 1997; Reyes et al., 2001; Minuth et al., 2003].

Grundlage für die Entwicklung eines für die Kultivierung humaner primärer Knochenvorläuferzellen geeigneten serumreduzierten Mediums waren Forschungsarbeiten, die in den vergangenen Jahren sowohl in fremden als auch dem eigenen Labor im Rahmen des EU-Projektes „Tissue reactor“ [Barthold et al., 2001; Barthold, 2003] durchgeführt wurden. Gronthos und Simmons [1995] untersuchten z.B. die Effizienz der Entstehung adhärenter Zellkolonien in aus humanen Knochenmarksaspiraten angelegten Kulturen, indem sie die Zellen in einem serumfreien Medium, das mit 25 rekombinanten Zytokinen einzeln und in

verschiedenen Kombinationen supplementiert wurde, kultivierten. Dabei erwiesen sich PDGF-BB und EGF als diejenigen Wachstumsfaktoren, die am wirksamsten die Entstehung der Einzelkolonien unterstützen. Die Kombination dieser beiden Wachstumsfaktoren vergrößerte signifikant den Durchmesser der Kolonien, während ihre Anzahl unverändert blieb. Reyes et al. [2001] gelang es, aus humanem Knochenmark isolierte Zellen erfolgreich in einem mit 2 % FBS, ITA, 10 ng/ml PDGF-BB und 10 ng/ml EGF angereicherten Medium zu expandieren und bis zu 53 Zellverdopplungen zu erreichen. Kuznetsov et al. [1997] stellten dagegen fest, dass für die Initiierung der Proliferation humaner MSC in serumfreiem Medium die Zugabe von mindestens vier Wachstumsfaktoren - PDGB-BB, EGF, FGF-2 und TGF- $\beta$ 2 erforderlich ist. Das Hauptaugenmerk wurde hierbei vor allem auf die spezifischen Anforderungen an Wachstumsfaktoren und deren mitogene Aktivität gerichtet, während der Einfluss der serumfreien oder serumreduzierten Medien auf den Verlauf der osteogenen Differenzierung nicht untersucht wurde.



**Abb. 3.17**

**Abnahme der Konzentration von Gesamtprotein, Gesamt-DNA (A) und Gesamt-RNA (B) nach dem Entzug der Wachstumsfaktoren.**

Für den Versuch wurden die aus einer heterotopen Ossifikation isolierten humanen osteogenen Zellen der 6. Passage verwendet. Die Zellen wurden in einer Zelldichte von  $1,2 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> in T75-Flaschen ausgesät und über 35 Tage in mit 1 % HS, osteogenen Supplementen und ITA angereichertem ZKT-I-Medium kultiviert. Medienwechsel wurde zweimal in der Woche vorgenommen. Während der ersten 7 Tage wurden dem Kulturmedium 10 ng/ml PDGF-BB und 10 ng/ml FGF-2 zugegeben. Am 7. Kultivierungstag d.h. am Tag der Konfluenz, der durch eine blau punktierte Linie gekennzeichnet ist, wurden die Wachstumsfaktoren aus dem Kulturmedium durch einen Medienwechsel entfernt.

Barthold [2003] hat in zahlreichen Experimenten mit primären osteogenen Rattenzellen ebenfalls eine Vielzahl an unterschiedlich supplementierten, serumreduzierten Medien getestet. In diesem Modellsystem hat ein mit 1 % FBS, osteogenen Supplementen, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Insulin, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Transferrin, 1 mg/ml Albumin, 10 ng/ml PDGF-BB und 10 ng/ml FGF-2 (bFGF) angereichertes ZKT-I-Medium den stärksten mitogenen Effekt gezeigt. Ein vergleichbares Ergebnis wurde bei der Verwendung eines Kulturmediums, das neben den genannten Substanzen noch zusätzlich 5 ng/ml EGF enthielt, erzielt. Nach dem Erreichen der Konfluenz konnten die Wachstumsfaktoren aus dem Medium entfernt und die osteogenen Rattenzellen anschließend unter serumreduzierten und zytokinfreien

Bedingungen weiterkultiviert werden. Dieser Schritt führte zu einer Beschleunigung des Differenzierungsprozesses und darüber hinaus zu einer deutlichen Kostenreduktion [Barthold et al., 2001; Barthold, 2003].

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit sollte das für die Kultivierung osteogener Rattenzellen entwickelte serumreduzierte Kultivierungsverfahren an das humane Modellsystem angepasst und, soweit möglich, weiter optimiert werden. Dafür wurden humane osteogene Zellen zuerst in einem Versuch unter den gleichen serumreduzierten Bedingungen wie osteogene Rattenzellen kultiviert. Dieses vorab durchgeführte Experiment zeigte allerdings, dass das für die Kultivierung primärer Rattenzellen entwickelte Verfahren auf das humane Modell nicht direkt übertragbar ist. Der Entzug der Wachstumsfaktoren nach dem Erreichen der Konfluenz (am 7. Tag der Kultivierung) führte zu einer sofortigen rapiden Reduzierung der Zellzahl, wie die Abnahme der Konzentration von Gesamt-DNA, Gesamt-RNA und des Gesamtproteins zeigte (siehe Abb. 3.17).

#### **3.4.1 Bestimmung der geeigneten Komposition von Wachstumsfaktoren**

Für die Ermittlung der optimalen Zusammensetzung der Wachstumsfaktoren wurde das aus einer heterotopen Ossifikation isolierte Zellmaterial verwendet. Zuerst wurden kryokonservierte Zellen der 6. Passage revitalisiert und über 4 Passagen im ZKT-I-Medium mit 10 % HS und osteogenen Supplementen vermehrt. Beim Übergang in die 10. Passage wurden die Zellen in einer Dichte von  $1,2 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> (9000 Zellen pro Kavität) in Kavitäten von 48-Loch-Platten, die vorher mit 1%iger Gelatine beschichtet wurden, in einem mit osteogenen Supplementen und 10 % HS angereicherten  $\alpha$ MEM ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt, die Zellschicht einmal mit warmer PBS gewaschen und anschließend die osteogenen Zellen für 20 Tage in vier unterschiedlich supplementierten  $\alpha$ MEM (siehe Tab. 3.5) unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) kultiviert. Die Zugabe der Wachstumsfaktoren in die serumreduzierten Kulturmedien erfolgte diesmal über den gesamten Zeitraum des Experiments. Als Positivkontrolle wurde ein mit 10 % HS angereichertes  $\alpha$ MEM eingesetzt. Medienwechsel und analytische Untersuchungen für die Bestimmung von Proliferation, Vitalität und Differenzierung osteogener Zellen wurden dreimal in der Woche durchgeführt. Dieser Test zur Ermittlung der optimalen Komposition von Wachstumsfaktoren wurde zweimal wiederholt, wobei beide Wiederholungen sehr ähnliche Daten lieferten. Die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments sind in den Abbildungen 3.18 und 3.20 dargestellt.

Wie in der Abbildung 3.18A zu sehen ist, sicherte eine kontinuierliche Zugabe der Wachstumsfaktoren die Proliferation der osteogenen Zellen fast über den gesamten Zeitraum des Experiments. Alle vier verwendeten Varianten der  $\alpha$ MEM-Supplementierung induzierten eine vergleichbare Zunahme der Zellzahl in der adhären Zellschicht, wobei die proliferative Aktivität der Zellen in dem mit allen drei verwendeten Wachstumsfaktoren,

d.h. PDGF-BB, FGF-2 und EGF, angereicherten Kulturmedium geringfügig größer war. In der Anfangsphase des Experiments wurden im Kulturüberstand der unter serumreduzierten Konditionen geführten Zellkulturen aber deutlich höhere LDH-Aktivitäten registriert, was auf einen größeren Anteil an lysierten Zellen hindeutete (Abb. 3.18B). Der Übergang zu einer serumreduzierten Kultivierung löste demnach in den betroffenen Zellkulturen eine schlagartige Intensivierung apoptotischer bzw. nekrotischer Prozesse aus, womit der Anstieg der LDH-Aktivität am 3. Kultivierungstag, d.h. unmittelbar nach diesem Vorgang, zu erklären ist. Auch in den nachfolgenden Tagen, nach dem die Zellkulturen einen konfluenten Zustand erreicht hatten (ca. 7. Kultivierungstag), blieben die LDH-Werte dieses biochemischen Parameters im Vergleich zur Positivkontrolle erhöht.

Tabelle 3.5

### Supplementierung von $\alpha$ MEM zur Ermittlung der optimalen Komposition von Wachstumsfaktoren

Ansatz	HS (%)	Osteogene Supplemente	ITA	PDGF-BB (ng/ml)	FGF-2 (ng/ml)	EGF (ng/ml)
<b>1</b> (Positivkontrolle)	<b>10</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>2</b>	<b>1</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>1</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>-</b>
<b>4</b>	<b>1</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>10</b>	<b>-</b>	<b>10</b>

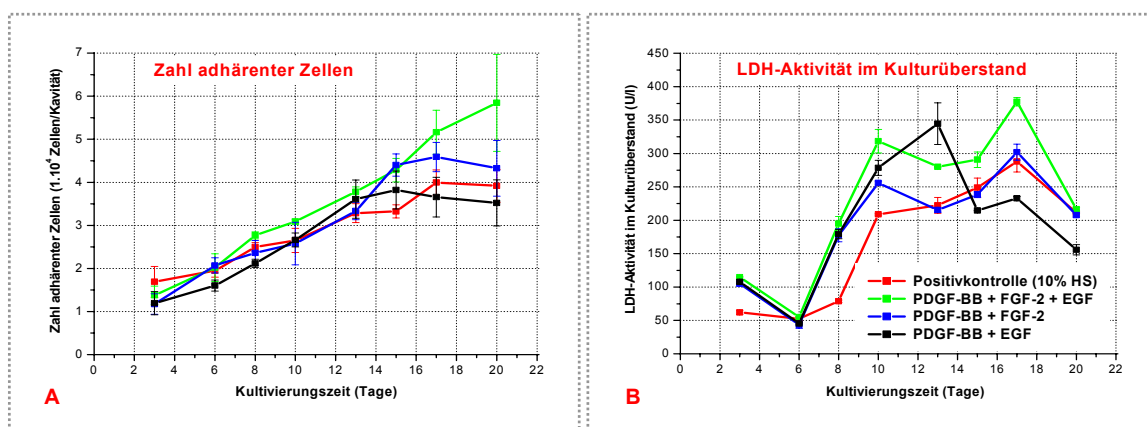
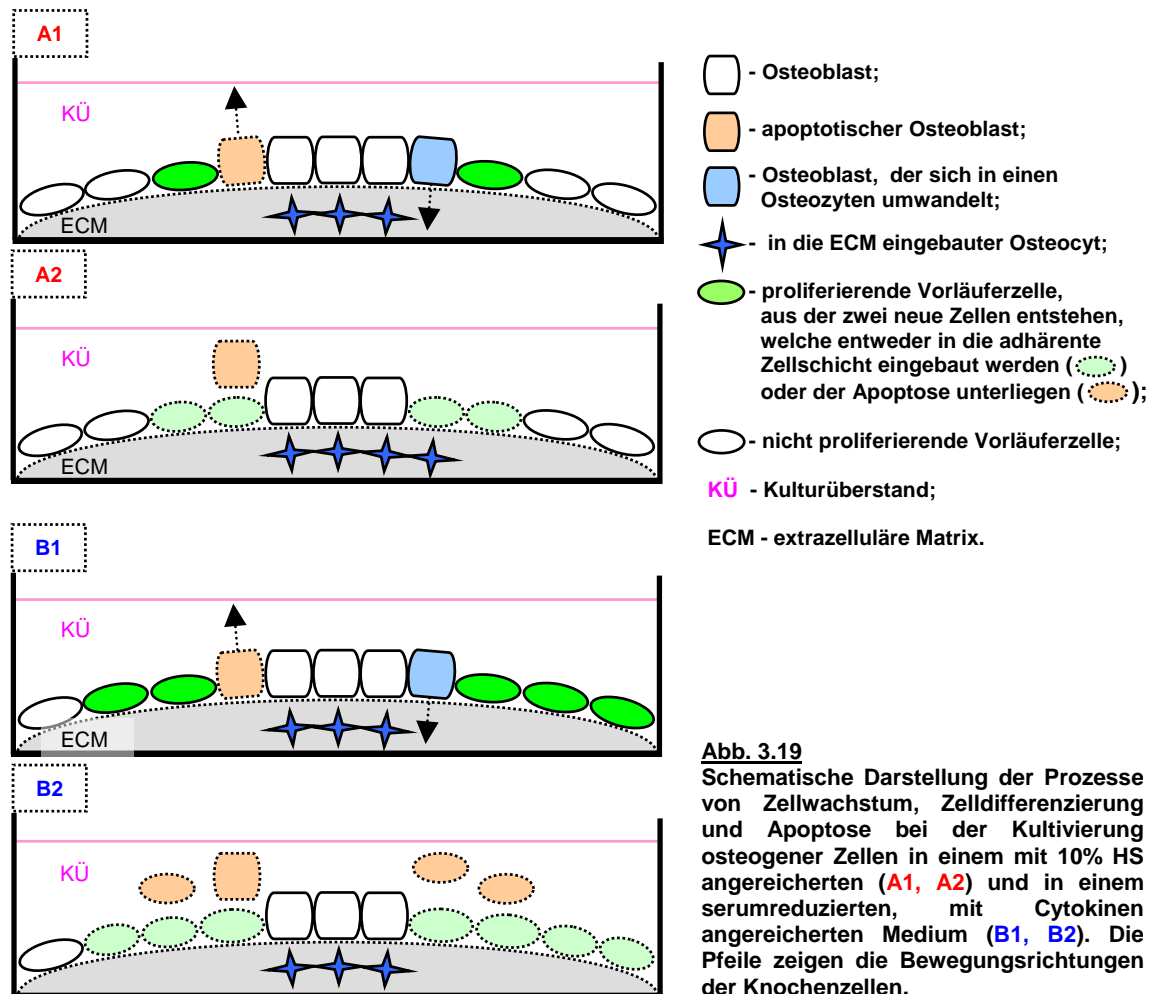


Abb. 3.18

**Proliferation und Vitalität humaner primärer osteogener Zellen während der Kultivierung in einem mit 10% HS angereicherten (Positivkontrolle) und in drei unterschiedlich supplementierten serumreduzierten Medien (siehe Tab. 3.5). A - Zahl adhärenter Zellen (indirekte Zellzahlbestimmung); B - LDH-Aktivität im Kulturüberstand.**

Da die Lysis apoptotischer Körper (sekundäre Nekrose) ebenfalls den Anstieg der LDH-Aktivität im Kulturüberstand verursachen kann, sind die Prozesse des programmierten und nekrotischen Zelltods in einer In-vitro-Kultur nur sehr schwer von einander zu trennen (siehe auch 3.1.1). Es lässt sich aber vermuten, dass die erhöhte LDH-Aktivität im Kulturüberstand der serumreduzierten Ansätze eher mit Prozessen der Apoptose bzw. der

sekundären Nekrose verbunden ist. Die stärker ausgeprägte Apoptose der Zellen könnte mehrere Ursachen haben.



Die Herabsetzung des Serumgehalts im Medium ist unvermeidbar mit der Reduzierung der Konzentration von im Serum enthaltenen lebenswichtigen Substanzen verknüpft. Dieser Vorgang verstärkt die apoptotischen Prozesse in den betroffenen Zellkulturen [Vaux & Strasser, 1996; Hill et al., 1997]. Solche Serumkomponenten wie Fibronectin, IL-6, Zytokine der TGF- $\beta$ -, und IGF-Familie haben z.B. eine antiapoptotische Wirkung und fördern das Aufrechterhalten der osteogenen Zellpopulation sowohl in vitro als auch in vivo [Hill et al., 1997; Globus et al., 1998; Jilka et al., 1998; Tumber et al., 2000; Hunter et al., 2001]. Das Überleben osteogener Zellen wird allerdings nicht durch eine einzige Substanz sondern durch ein breites Spektrum gleichzeitig wirkender und sich gegenseitig beeinflussender Zytokine, Serumproteine und Matrix-Komponenten gesichert. Der Großteil dieser Substanzen ist wahrscheinlich noch weitgehend unbekannt und muss erst identifiziert werden [Hill et al., 1997].

Die erhöhte LDH-Aktivität in den serumreduzierten Ansätzen könnte ebenfalls ein zu starkes Zellwachstum auslösen (Abb. 3.19). Das Gleichgewicht zwischen den Prozessen der Zellproliferation und -differenzierung ist für einen ausgeglichenen Verlauf der In-vitro-Osteogenese offensichtlich von großer Bedeutung. Während einer kontinuierlich fortschreitenden osteogenen Differenzierung schaffen drei parallel verlaufende Prozesse, nämlich die Entstehung von 3D-Matrixstrukturen (Nodules), die sukzessive Umwandlung von Osteoblasten in Osteozyten bei gleichzeitiger Einlagerung in die zuvor produzierte ECM sowie der programmierte Zelltod eines Teils der reifen Osteoblasten, neue Anhaftungsflächen für die „neugeborenen“ Tochterzellen. Wenn die Geschwindigkeit der Zellproliferation zu groß ist, kann ein gewisser Anteil der neu entstandenen Zellen nicht sofort in die adhärente Zellschicht eingebaut werden. Diese Zellen, die den Kontakt mit benachbarten Zellen und mit der ECM verlieren, unterliegen erst der Apoptose und nachfolgend der sekundären Nekrose.

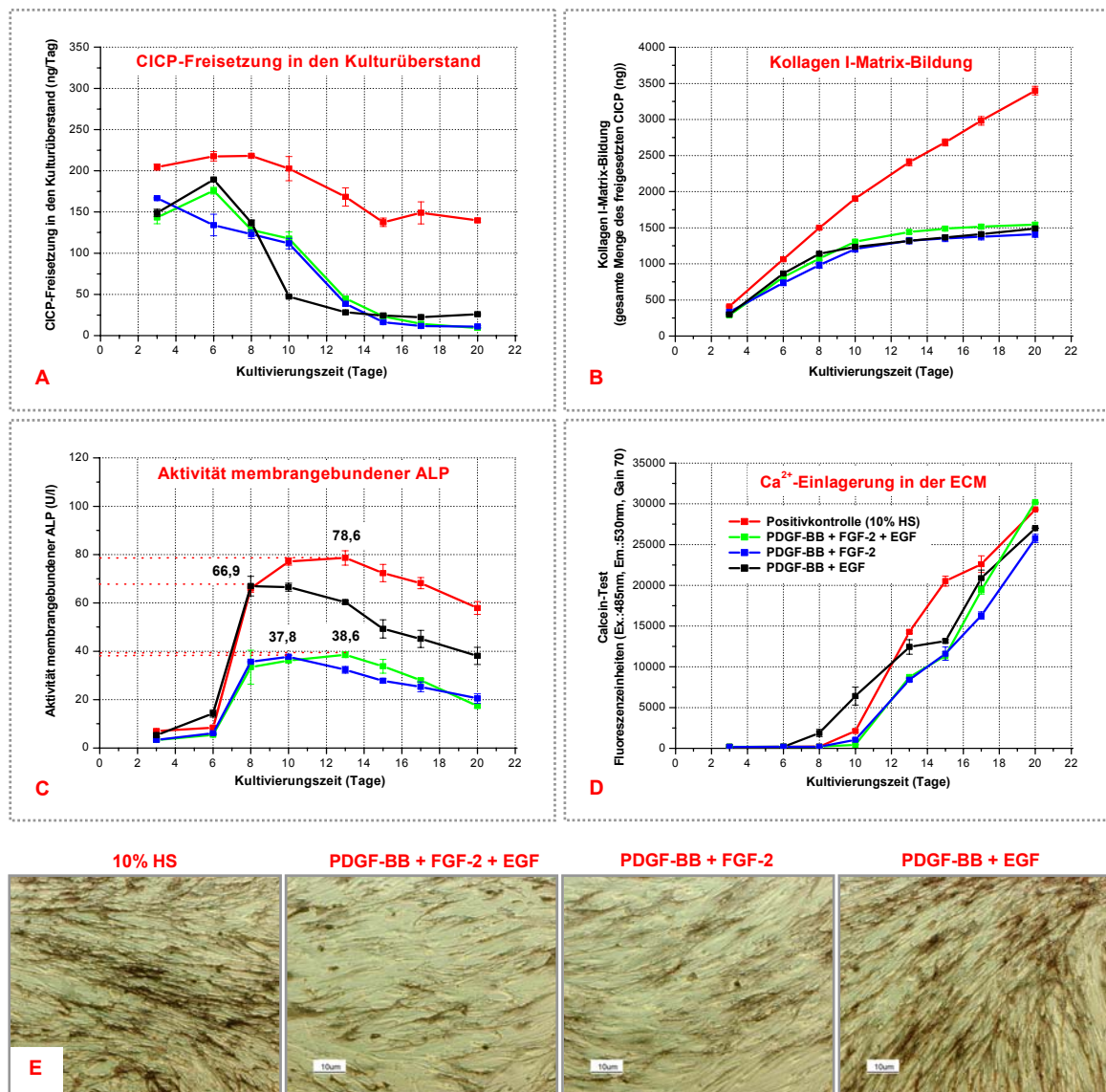
Die höhere Rate abgestorbener Zellen ist eventuell auch mit einer nicht ausreichenden Adhäsion der Zellen verbunden. Serum enthält Spreading- und Adhäsionsfaktoren, deren zu geringer Gehalt in einem serumreduzierten Medium möglicherweise das Anhaften der Zellen erschwert und damit unvermeidlich zur Apoptose der betroffenen Zellen führt. Es ist zudem nachgewiesen, dass eine andauernde Einwirkung von Wachstumsfaktoren (siehe 1.2.2.4) den Vorgang des programmierten Zelltods in der Population reifer Osteoblasten hervorrufen kann. Da osteogene Kulturen meist eine Mischung aus Zellen unterschiedlicher Entwicklungsstadien darstellen, könnte dieses Phänomen auch schon in der Anfangsphase des Experiments auftreten und ebenfalls den Anstieg der LDH-Aktivität verursachen.

Ein oder eher mehrere dieser Ereignisse überlagern sich offensichtlich mit der ganz normalen Zunahme der LDH-Aktivität, wie sie mit einer voranschreitenden Differenzierung, d.h. mit der zunehmenden Ausbildung der ECM und deren Mineralisierung verbunden ist [Lynch et al., 1998]. Da die durchgeführte Zellzahlbestimmung nur den Anteil von in der ECM eingebauten und auf ihrer Oberfläche befindlichen Zellen widerspiegelt, ist die mitogene Wirkung der serumreduzierten Medien, die durch eine extra Zugabe von Wachstumsfaktoren induziert wird, offensichtlich viel stärker ausgeprägt als die ermittelten Zellzahlen ergeben.

Die Analyse des Verlaufs der Zelldifferenzierung zeigte, dass die unter serumreduzierten Bedingungen geführten Zellkulturen eine viel geringere Intensität der Kollagen I-Synthese, einen wesentlich kleineren Umfang der insgesamt angelegten ECM und eine deutlich niedrigere Aktivität membrangebundener ALP im Vergleich zur Positivkontrolle aufweisen. Der Mineralisierungsgrad der ECM war in allen experimentellen Ansätzen am Ende der Kultivierung jedoch annähernd gleich (Abb. 3.20D). Die Geschwindigkeit, mit der die Knochenvorläuferzellen ausdifferenzieren und in ein reiferes Entwicklungsstadium übergehen, war in den serumreduzierten Ansätzen allerdings viel höher. So nahm die



Intensität von Kollagen I-Synthese und ALP-Aktivität in diesen Zellkulturen früher und deutlicher ab.



**Abb. 3.20**

Differenzierung humaner osteogener Zellen während der Kultivierung in einem mit 10 % HS angereicherten (Positivkontrolle) und in drei unterschiedlich supplementierten serumreduzierten Medien (siehe Tab. 3.5). **A** - Kinetik der Kollagen I-Synthese (Kinetik der C1CP-Freisetzung in den Kulturüberstand); **B** - Bildung der Kollagen I-Matrix (die zu einem bestimmten Zeitpunkt insgesamt freigesetzte Menge an C1CP); **C** - Aktivität der membrangebundenen ALP; **D** - Ca<sup>2+</sup>-Einlagerung in der ECM (Calcein-Test); **E** - ALP-Färbung, die am 8. Tag der Kultivierung durchgeführt wurde.

Es ist nicht ausgeschlossen, dass die verringerte Expression von Kollagen I und ALP bzw. das schnelle Ausdifferenzieren der Knochenvorläuferzellen mit einem zu niedrigen Gehalt an anderen, ebenfalls die Osteogenese regulierenden Zytokinen im serumreduzierten Medium verbunden ist. In zahlreichen Publikationen wird jedoch auch ein inhibierender Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die osteogene Differenzierung erwähnt, wobei der erreichte Effekt in großem Maße von dem verwendeten Zellmaterial, dem Entwicklungsstadium der osteogenen Zellen, der gewählten Konzentration und der

Einwirkungsdauer des verwendeten Wachstumsfaktors abhängig ist [Aubin & Liu, 1996; Triffitt, 1996; Yoneda, 1996; Martin et al., 1997; Mansukhani et al., 2000; Kalajzik et al., 2003; Chaudhary et al., 2004].

In den durchgeführten Experimenten zeigten diejenigen serumreduzierten Medien, die mit FGF-2 (bFGF) angereichert wurden, allerdings die stärkste hemmende Wirkung. Die maximale Aktivität der membrangebundenen ALP war in den entsprechenden Zellkulturen um 50,9 % (Ansatz 2) und 51,9 % (Ansatz 3) niedriger als in der Positivkontrolle (Abb. 3.20C, Tab. 3.5). Diese Ergebnisse bestätigte auch die am 8. Kultivierungstag durchgeführte ALP-Färbung, welche die ALP-positiven Zellen dunkelviolett tönt. Wie in der Abbildung 3.20E zu sehen ist, war die Intensität der Färbung in den experimentellen Ansätzen 2 und 3 deutlich schwächer ausgeprägt. In diesen wurde ebenfalls ein etwas späterer Beginn der Matrix-Mineralisierung beobachtet (Abb. 3.20D). Es wird angenommen, dass FGF-2 zwei unterschiedliche Effekte auf osteogene Zellen ausübt. Er fördert z.B. die Proliferation von frühen Osteoprogenitorzellen, wobei die Fähigkeit der Zellen zu einer späteren osteogenen Differenzierung nach dem Wegfall dieses Wachstumsfaktors erhalten bleibt [Martin et al., 1997; Kalajzik et al., 2003]. Zellen, die ein präosteoblastäres Entwicklungsstadium erreicht haben, werden dagegen nicht zu einer Proliferation angeregt. Hier bewirkt FGF-2 die Inhibition des Differenzierungsprozesses, was mit einer charakteristischen Abnahme der ALP-Aktivität verbunden ist. In der Population reifer Osteoblasten intensiviert FGF-2 zudem den Vorgang des programmierten Zelltods [Mansukhani et al. 2000; Marie, 2003]. Wahrscheinlich sind mit diesen Phänomenen auch die Ergebnisse des vorliegenden Experiments zu erklären.

Im Vergleich zur Positivkontrolle waren die Abweichungen im Differenzierungsprozess humaner osteogener Zellen während der Kultivierung in einem mit 10 ng/ml PDGF-BB und 10 ng/ml EGF angereicherten serumreduzierten Medium am geringsten ausgeprägt. Dieses Medium wurde deshalb für die weiteren Optimierungsexperimente ausgewählt. Der Serumgehalt im selektierten Medium wurde jedoch bei der Durchführung der folgenden Versuche auf 2 % verdoppelt.

### 3.4.2 Bestimmung der geeigneten Konzentration von Wachstumsfaktoren

Eine ununterbrochene Kultivierung osteogener Zellen in einem mit Wachstumsfaktoren angereicherten Medium stellt einen erheblichen Kostenfaktor dar. In dem nachfolgenden Experiment wurde deshalb überprüft, wie die Reduzierung der Konzentration von Wachstumsfaktoren die Proliferation und Differenzierung humaner osteogener Zellen beeinflusst. Der Serumgehalt wurde in den mit PDGF-BB und EGF supplementierten Medien (Tab. 3.6) auf 2 % erhöht, um auf diese Weise in dem Kulturmedium auch die Konzentrationen anderer die Osteogenese stimulierender Substanzen zu steigern. Für den Versuch wurde das gleiche, aus einer heterotopen Ossifikation isolierte Zellmaterial

verwendet. Die Zellen wurden wie oben beschriebenen (siehe 3.4.1) revitalisiert, vermehrt und ausplattiert. Zur Isolation der Gesamt-RNA wurden die Zellen noch zusätzlich in vier T25-Flaschen in der gleichen Zelldichte ( $1,2 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>) ausgesät und unter identischen Bedingungen kultiviert. Das Experiment war diesmal für einen Zeitraum von 31 Tagen ausgelegt. Die Ergebnisse des Versuchs sind in den Abbildungen 3.21, 3.22 und 3.23 dargestellt.

Tabelle 3.6

### Supplementierung von $\alpha$ MEM zur Ermittlung der optimalen Konzentration von Wachstumsfaktoren

Ansatz	HS (%)	Osteogene Supplemente	ITA	PDGF-BB (ng/ml)	EGF (ng/ml)
1 (Positivkontrolle)	10	+	-	-	-
2	2	+	+	10	10
3	2	+	+	5	5
4	2	+	+	2,5	2,5

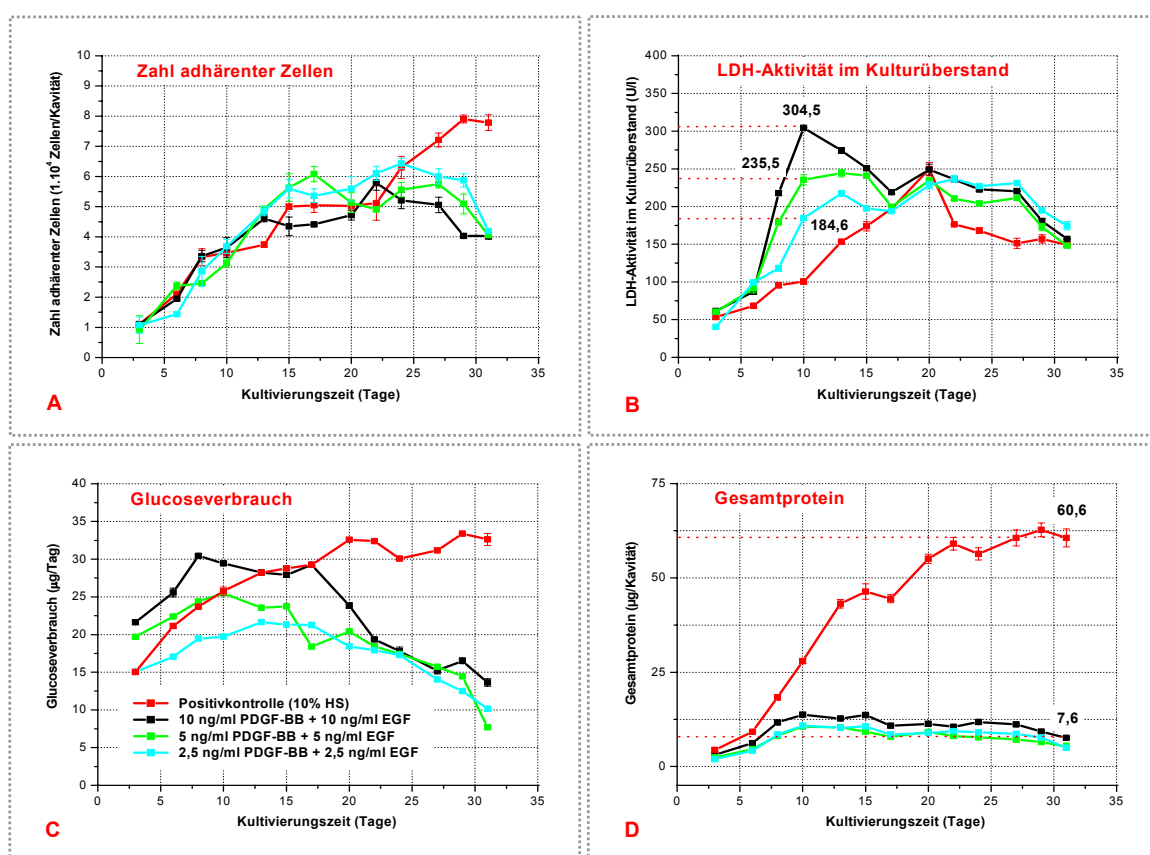
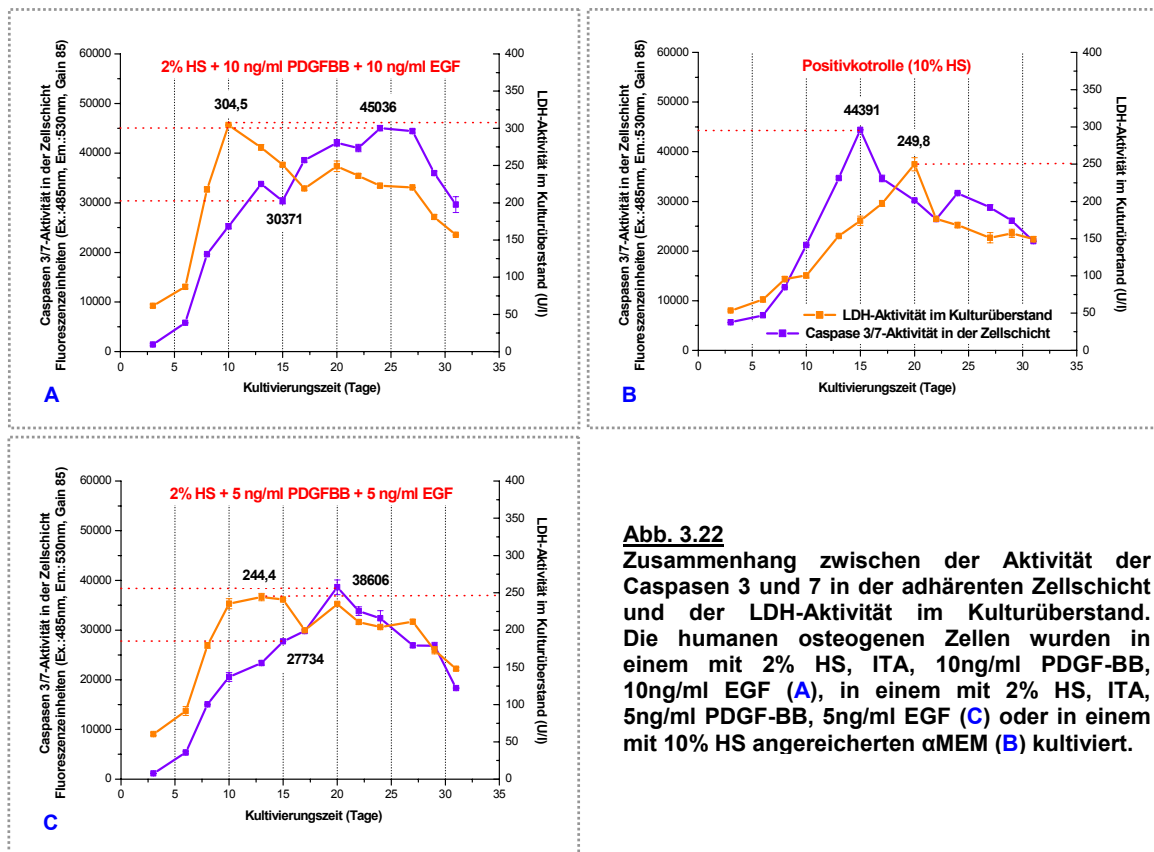


Abb. 3.21

Proliferation, metabolische Aktivität und Vitalität humaner primärer osteogener Zellen während der Kultivierung in einem mit 10 % HS und in drei mit 2 % HS, ITA, PDGF-BB und EGF angereicherten Medien (siehe Tab. 3.6). **A** - Zahl adhärenter Zellen (indirekte Zellzahlbestimmung); **B** - LDH-Aktivität im Kulturüberstand; **C** - D-Glucoseverbrauch; **D** - Gesamtprotein.

Wie Abbildung 3.21A zeigt, nahm der Pool adhärenter Zellen in allen vier experimentellen Ansätzen bis zum etwa 24. Kultivierungstag mit einer vergleichbaren Intensität zu.

Die Veränderungen der Zellzahl in der adhärennten Schicht waren dabei nur geringfügig von der verwendeten Konzentration der Wachstumsfaktoren abhängig. In der Endphase des Langzeitexperiments wurde in allen serumreduzierten Ansätzen aber eine eindeutige Reduzierung der Zahl adhärenter Zellen registriert; in den parallel als Positivkontrolle geführten Zellkulturen wurde das Zellwachstum hingegen bis zum Ende des Versuchs beobachtet.



**Abb. 3.22**

Zusammenhang zwischen der Aktivität der Caspasen 3 und 7 in der adhärennten Zellschicht und der LDH-Aktivität im Kulturüberstand. Die humanen osteogenen Zellen wurden in einem mit 2% HS, ITA, 10ng/ml PDGF-BB, 10ng/ml EGF (A), in einem mit 2% HS, ITA, 5ng/ml PDGF-BB, 5ng/ml EGF (C) oder in einem mit 10% HS angereicherten  $\alpha$ MEM (B) kultiviert.

Im Vergleich zur Positivkontrolle wurde im Kulturüberstand aller drei serumreduzierten Ansätze jedoch eine höhere LDH-Aktivität und somit ein größerer Anteil lysierter Zellen registriert (Abb. 3.21B). In der ersten Hälfte des Experiments korrelierten die LDH-Aktivitätswerte eindeutig mit der Zunahme der Konzentration von Wachstumsfaktoren. So wurde am 10. Kultivierungstag im Kulturüberstand des 2. experimentellen Ansatzes (Zytokinkonzentration 10 ng/ml) eine 3,03-mal höhere, im Kulturüberstand des 3. Ansatzes (Zytokinkonzentration 5 ng/ml) eine 2,34-mal höhere und im Kulturüberstand des 4. Ansatzes (Zytokinkonzentration 2,5 ng/ml) eine 1,83-mal höhere LDH-Aktivität als in der Positivkontrolle bestimmt. Diese Ergebnisse unterstützen nochmals die Hypothese, dass die bloße Ermittlung der Zahl adhärenter Zellen nicht immer eine zuverlässige Information über die Intensität des Zellwachstums liefert. Alle drei mit Wachstumsfaktoren angereicherten Medien induzierten offensichtlich eine viel stärkere Proliferation osteogener Zellen als ein mit 10 % HS supplementiertes Kulturmedium. Die Intensität der

Zellproliferation und des damit einhergehenden Zelltods waren dabei eindeutig von der verwendeten Konzentration der Wachstumsfaktoren abhängig.

Die Analyse des Zusammenhangs zwischen der Zellproliferation sowie den apoptotischen und nekrotischen Prozessen (eine parallele Ermittlung der LDH-Aktivität im Kulturüberstand und der Aktivität der Caspasen 3 und 7 in der adhärennten Zellschicht) belegte, dass in den serumreduzierten Ansätzen während der ersten Hälfte des Experiments, d.h. in der Phase eines intensiven Zellwachstums, mehr lysierte Zellen vorliegen bzw. mehr Zellen das Endstadium der Apoptose durchlaufen (Abb. 3.22). In der adhärennten Zellschicht der Positivkontrolle war dagegen der Anteil von Zellen, in denen die apoptotischen Prozesse gerade eingeleitet wurden, etwas größer (Abb. 3.22). Am 15. Kultivierungstag war z.B. die Aktivität der Caspasen 3 und 7 in der Positivkontrolle 1,46-mal höher als in der adhärennten Zellschicht des 2. Ansatzes (Zytokinkonzentration 10 ng/ml) und 1,60-mal höher als in der adhärennten Zellschicht des 3. Ansatzes (Zytokinkonzentration 5 ng/ml). Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass in serumreduzierten Ansätzen die erhöhte LDH-Aktivität vorwiegend mit einem zu starken Zellwachstum und einem fehlenden Ausgleich zwischen den Prozessen der Zellproliferation und -differenzierung verbunden ist (siehe Abb. 3.19). Damit ist auch der rapide Anstieg der LDH-Aktivität im Kulturüberstand serumreduzierter Ansätze nach dem Erreichen eines konfluenten Zustands (ca. 7. Kultivierungstag) zu erklären. In den als Positivkontrolle geführten Zellkulturen war die Apoptose der Zellen offenbar größtenteils mit dem Prozess der osteogenen Differenzierung verbunden.

Interessante Informationen lieferte die Ermittlung der Konzentration von Gesamtprotein. Wie die Abbildung 3.21D eindeutig zeigt, war in den Zellkulturen der Positivkontrolle der Gesamtgehalt an intra- und extrazellulären Proteinen schon ab dem 8. Kultivierungstag wesentlich höher als in den drei serumreduzierten Ansätzen. Diese Ergebnisse stimmen mit den Literaturdaten überein und beweisen, dass die ECM des Knochengewebes im Normalfall substantielle Mengen an Serumproteinen enthält [Boskey, 1991; Heinegård & Oldberg, 1989; Robey, 1996]. Die meisten dieser externen Proteine werden in der Leber oder im hämatopoetischen Gewebe synthetisiert. Über Blutbahn bzw. Kulturmedium erreichen sie das Knochengewebe, wo sie absorbiert, eingelagert und dabei akkumuliert werden. So ist z.B. die Konzentration von Albumin im Knochengewebe mehrere Male, die von Fetuinen ( $\alpha_2$ -HS-Glycoproteinen) sogar etwa 100-mal höher als im Blut [Robey, 1996]. Diese beiden Substanzen sind als systemische Inhibitoren der Calcifizierung bekannt. Albumin z.B. verhindert den Calcifizierungsprozess, indem es maßgeblich die Verteilung zwischen dem so genannten freien, ionisierbaren Pool und den proteingebundenen, komplexierten Pool von Calcium bestimmt. Fetuine binden dagegen neu gebildetes Calciumphosphat und bewirken, dass es sofort kolloidal stabilisiert wird und daher nicht spontan ausfallen kann [Jahnen-Dechent, 2004]. Außer den erwähnten Proteinen, werden in der ECM des Knochengewebes z.B. auch Immunoglobuline, Trägerproteine, Zytokine, Chemokine und



größere Mengen an Fibronectin inkorporiert. Wenn das Kulturmedium hingegen weniger Serumproteine enthält, können sie auch nur in einem entsprechend geringeren Ausmaß in die ECM eingebaut werden. Das erklärt die großen Unterschiede in der Proteinkonzentration, welche zwischen der Positivkontrolle und den serumreduzierten Ansätzen registriert wurden. Das intrazelluläre Protein stellt im Knochengewebe bzw. in

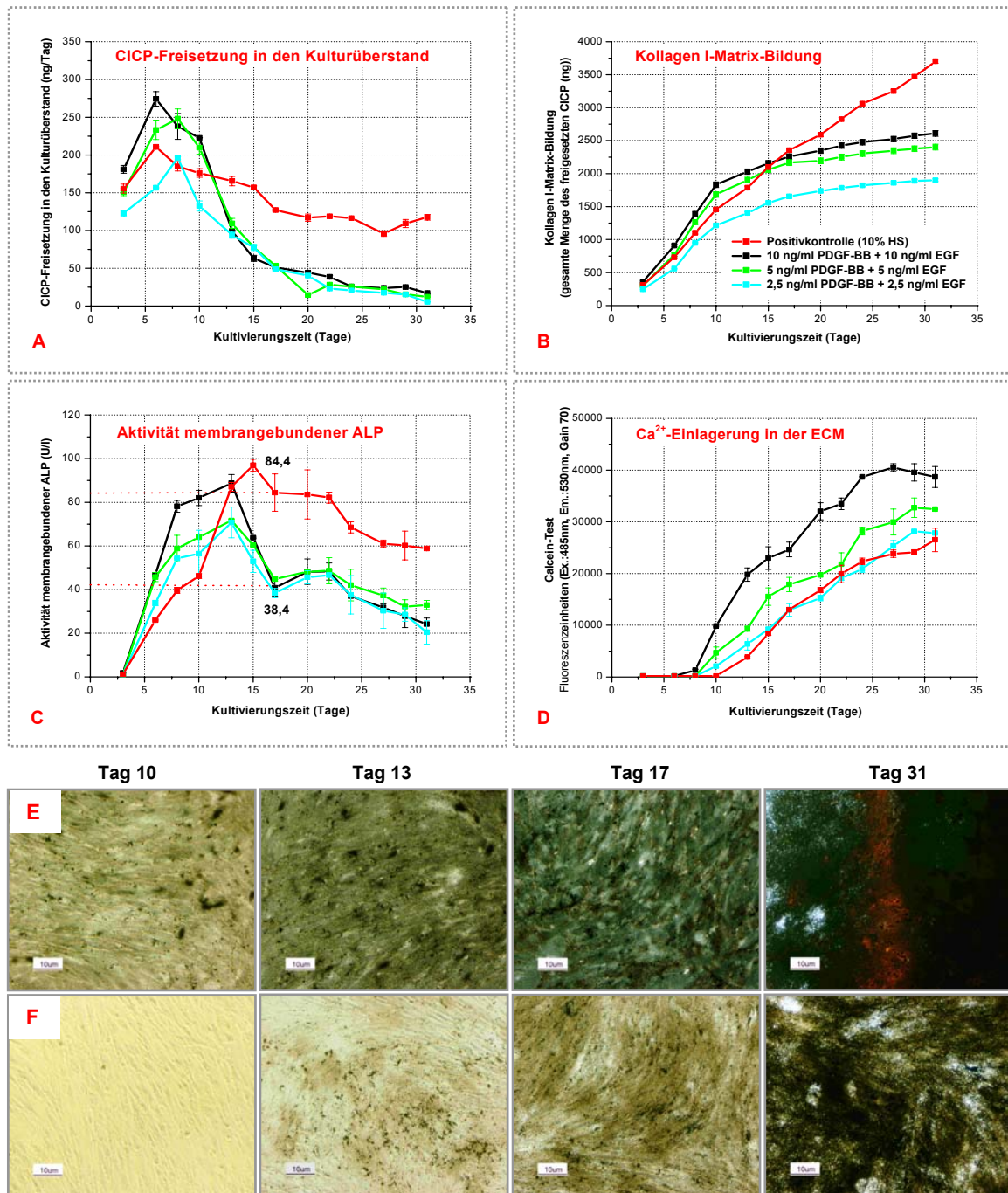


Abb. 3.23

Differenzierung humaner osteogener Zellen während der Kultivierung in einem mit 10 % HS und in drei mit 2 % HS, ITA, PDGF-BB und EGF angereicherten Medien (siehe Tab. 3.6). **A** - Kinetik der C1CP-Freisetzung in den Kulturüberstand; **B** - Kollagen I-Matrix-Bildung (die zu einem bestimmten Zeitpunkt insgesamt freigesetzte Menge an C1CP); **C** - Aktivität membrangebundener ALP; **D** - Ca<sup>2+</sup>-Einlagerung in der ECM (Calcein-Tst), **E** - Mineralisierung der ECM (Von-Kossa-Färbung) während der Kultivierung in einem mit 2 % HS, ITA, 10 ng/ml PDGF-BB und 10 ng/ml EGF angereicherten Medium, **F** - Mineralisierung der ECM (Von-Kossa-Färbung) während der Kultivierung in einem mit 10 % HS angereicherten Medium.

Zellkulturen, die nicht unter serumreduzierten oder serumfreien Kultivierungsbedingungen geführt werden, offensichtlich nur einen geringen Teil des gesamten Proteingehalts dar.

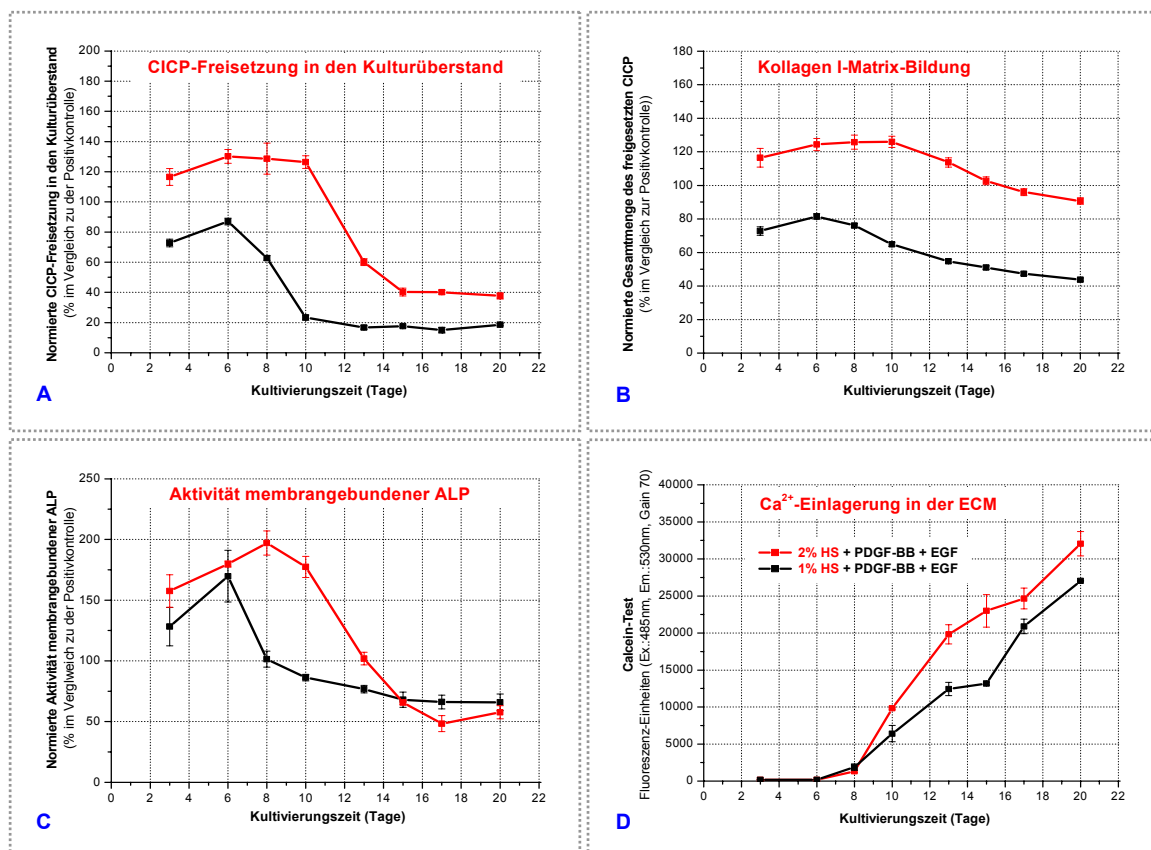
Die Untersuchung der Zelldifferenzierung belegte erneut, dass durch eine serumreduzierte Kultivierung dieser Prozess deutlich beschleunigt wird. Im Vergleich zur Positivkontrolle wurden in den serumreduzierten Ansätzen sowohl ein schnellerer Anstieg und Abfall von Kollagen I-Synthese und ALP-Aktivität als auch ein früherer Beginn und ein höherer Grad der ECM-Mineralisierung beobachtet (Abb. 3.23). Diese Daten stimmen mit denjenigen überein, die in unserer Arbeitsgruppe in Versuchen mit osteogenen Rattenzellen gewonnen wurden [Barthold, 2003], und deuten zweifellos darauf hin, dass in den betroffenen Zellkulturen recht schnell ein relativ hoher Anteil von postmitotischen, metabolisch und sekretorisch wenig aktiven Osteozyten erreicht wird. Ab etwa dem 23. Kultivierungstag war in den serumreduzierten Ansätzen der Anteil der zu einer Proliferation befähigten Progenitorzellen schon sehr gering und der zu einer intensiven ALP-Synthese fähigen Osteoblasten deutlich geringer als in der Positivkontrolle. Dies zeigt sich auch in der Reduzierung des Glucoseverbrauchs (Abb. 3.21C) und in der Abnahme der Zahl adhärenter Zellen (Abb. 3.21A), die in diesen Zellkulturen während der zweiten Hälfte des Langzeiteperiments ermittelt wurden.

Die Differenzierungsgeschwindigkeit der osteogenen Progenitorzellen wurde durch den Gehalt an Wachstumsfaktoren praktisch nicht beeinflusst. Die Steigerung ihrer Konzentration erhöhte aber die Kollagen I-Produktion, die ALP-Synthese und demzufolge den Mineralisierungsgrad der ECM. Die verwendeten Wachstumsfaktoren übten somit keinen hemmenden Einfluss auf die Expression dieser knochenspezifischen Marker aus. Es bleibt allerdings unklar, wie diese positive Wirkung hervorgerufen wurde - direkt, d.h. über eine sofortige Intensivierung der Transkription zuständiger Gene, oder indirekt, d.h. über die Aktivierung derjenigen Gene, die z.B. für die Synthese anderer regulatorischer Zytokine oder ihrer Rezeptoren verantwortlich sind.

Die Erhöhung des Serumgehalts in dem mit Wachstumsfaktoren supplementierten Medium milderte den Übergang zu einer serumreduzierten Kultivierung (siehe Abb. 3.18B, 3.21B) und wirkte sich zugleich vorteilhaft auf die Expression der bereits genannten knochenspezifischen Marker aus. Abbildung 3.24 illustriert die Veränderungen in der Kollagen I-Synthese, in der ALP-Aktivität und im Mineralisierungsgrad der ECM während der Kultivierung humaner osteogener Zellen in einem Kulturmedium, das mit 1 % oder 2 % HS und ITA, PDGF-BB, EGF angereichert wurde. Da die Grafiken Ergebnisse aus zwei zeitlich getrennt durchgeführten Experimenten zeigen, wurden die gemessenen Werte auf die der jeweiligen Positivkontrollen normiert. Wie deutlich zu sehen ist, wurden während der Kultivierung in dem mit 2 % HS angereicherten Medium eine stärkere Kollagen I-Synthese und eine höhere ALP-Aktivität registriert. In diesen Zellkulturen waren dementsprechend auch die Gesamtmenge der angelegten Kollagen I-Matrix und ihr

Mineralisierungsgrad größer. Der etwas langsamere Anstieg und Abfall der Kollagen I-Produktion und der ALP-Aktivität deuten außerdem auf ein langsames Ausdifferenzieren der Knochenvorläuferzellen hin.

Die verminderte Expression knochenspezifischer Marker bei der Kultivierung in einem serumreduzierten Medium ist damit vorwiegend auf einen niedrigeren Gehalt an anderen regulatorischen Serumsstoffen und auf ein sehr schnelles Ausdifferenzieren der Vorläuferzellen zurückzuführen.



**Abb. 3.24**

Differenzierung humaner osteogener Zellen während der Kultivierung in einem mit 1 % HS, ITA, 10 ng/ml PDGF-BB, 10 ng/ml EGF und in einem mit 2 % HS, ITA, 10 ng/ml PDGF-BB, 10 ng/ml EGF angereicherten Medium. Die Werte der ALP-Aktivität, der CACP-Konzentration im Kulturüberstand und der Gesamtmenge angelegter Kollagen I-Matrix wurden auf die Werte der entsprechenden Positivkontrollen normiert. **A** - Kinetik der Kollagen I-Synthese (Kinetik der CACP-Freisetzung in den Kulturüberstand); **B** - Bildung der Kollagen I-Matrix (die zu einem bestimmten Zeitpunkt insgesamt freigesetzte Menge an CACP); **C** - Aktivität membrangebundener ALP; **D** - Ca<sup>2+</sup>-Einlagerung in der ECM (Calcein-Test).

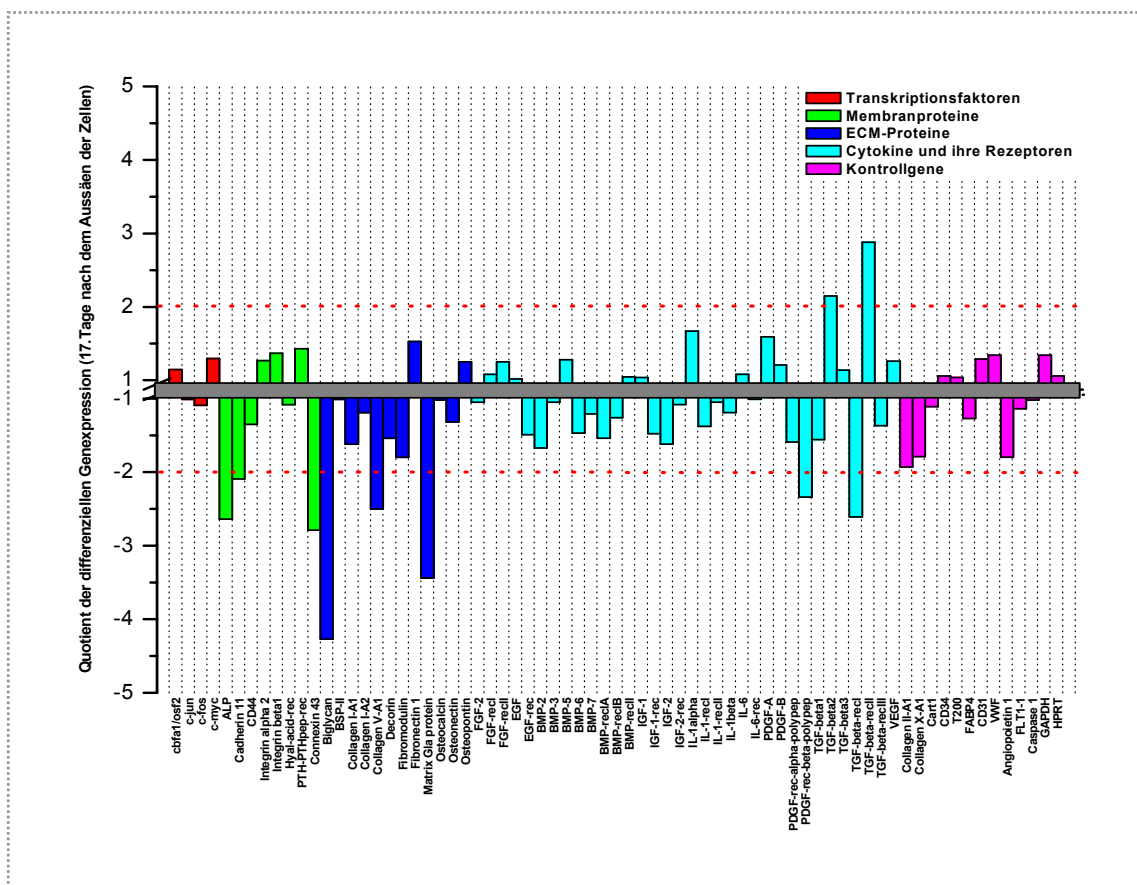
Die Ergebnisse des Experiments zeigen, dass primäre osteogene Humanzellen etwa 15 Tage lang auch in einem mit 2 % HS, PDGF-BB und EGF angereicherten Medium kultiviert werden können. Da die Halbierung des Gehalts an Wachstumsfaktoren den Anteil von apoptotischen Zellen in der Zellkultur reduziert (siehe Abb. 3.21B) und gleichzeitig die Zahl an adhärenz Zellen (siehe Abb. 3.21A) und den Umfang der angelegten Kollagen I-Matrix nur mäßig verändert (siehe Abb. 3.23B), kann die PDGF-BB- und EGF-Konzentration im serumreduzierten Medium offensichtlich auf 5 ng/ml verringert werden. Eine langfristige Kultivierung humaner primärer osteogener Zellen unter diesen



Bedingungen führt jedoch zu einer erheblichen und schnellen Abnahme des Anteils an osteogenen Vorläuferzellen und synthetisch aktiven Osteoblasten.

### 3.4.3 Vergleich des Genexpressionsprofils bei der Kultivierung humaner osteogener Zellen in mit 10 % Humanserum angereichertem und in serumreduziertem Medium

Um einen detaillierten Einblick in den Prozess der In-vitro-Osteogenese unter serumreduzierten Kultivierungsbedingungen zu erhalten, wurde eine Microarray-Analyse der differentiellen Genexpression durchgeführt. Bei der cDNA-Synthese wurde die aus dem zweiten experimentellen Ansatz (Zytokinkonzentration 10 ng/ml) gewonnene RNA als Analyse, die aus der Positivkontrolle isolierte RNA als Referenz definiert. Die berechneten Quotienten der differentiellen Genexpression zeigen damit eine Zunahme oder Abnahme des Expressionsgrads untersuchter Gene bei der Kultivierung in einem serumreduzierten Medium im Vergleich zur Positivkontrolle auf. Die RNA aus beiden Ansätzen wurde zum selben Zeitpunkt, d.h. am 17. Tag des Langzeitexperiments isoliert.



**Abb. 3.25**

Ergebnisse der Analyse der differentiellen Genexpression. Die aus einer heterotopen Ossifikation isolierten osteogenen Zellen wurden entweder in einem mit 2 % HS, ITA, 10 ng/ml PDGF-BB, 10 ng/ml EGF oder in einem mit 10 % HS angereicherten  $\alpha$ MEM kultiviert. Beim durchgeführten Microarray-Experiment wurde die aus dem zweiten experimentellen Ansatz (Zytokinkonzentration 10 ng/ml) gewonnene RNA als Analyse, die aus der Positivkontrolle isolierte RNA als Referenz definiert. Die rot punktierte Linie kennzeichnet die Signifikanzgrenze der differentiellen Genexpression. Die Gesamt-RNA für die Microarray-Analyse wurde aus jeweils einer Flaschenkultur (T25-Kulturflasche) am 17. Tag des Experiments isoliert.

Wie aus Abbildung 3.25 und Tabelle 3.7 ersichtlich ist, löste die serumreduzierte Kultivierung bei lediglich 10 der untersuchten Gene eine statistisch relevante Veränderung im Expressionsgrad aus. Dabei wurde die Expression der meisten von ihnen (8 von 10) reduziert.

**Tabelle 3.7**

**Statistisch relevante Unterschiede in der Expression untersuchter Gene bei der Verwendung eines mit 2 % HS, ITA, 10 ng/ml PDGF-BB und 10 ng/ml EGF angereicherten  $\alpha$ MEM im Vergleich zur Positivkontrolle**

Nr.	Name des Gens in der NCBI-Datenbank und benutzte Abkürzung	Gennummer	Quotient
<u>Membranproteine</u>			
1.	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney ( <b>ALP</b> )	XM_001826	<b>-2,63</b>
2.	Cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast) ( <b>Cadherin11</b> )	XM_043283	<b>-2,09</b>
3.	Gap junction protein, alpha 1, 43 kDa ( <b>Connexin 43</b> )	XM_027460	<b>-2,79</b>
<u>ECM-Proteine</u>			
4.	Biglycan ( <b>Biglycan</b> )	XM_042153	<b>-4,27</b>
5.	Collagen, type V, alpha 1 ( <b>Collagen V-A1</b> )	XM_002069	<b>-2,50</b>
6.	Matrix Gla protein ( <b>Matrix Gla protein</b> )	XM_032759	<b>-3,44</b>
<u>Wachstums-, Differenzierungsfaktoren und ihre Rezeptoren</u>			
7.	Platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide ( <b>PDGF-rec-beta-polypep</b> )	XM_015815	<b>-2,34</b>
8.	Transforming growth factor, beta 2 ( <b>TGF-beta2</b> )	XM_001754	<b>+2,15</b>
9.	Transforming growth factor, beta receptor I ( <b>TGF-beta-recl</b> )	XM_005591	<b>-2,69</b>
10.	Transforming growth factor, beta receptor II ( <b>TGF-beta-recll</b> )	XM_003094	<b>+2,88</b>

In der Gruppe der Membranproteine wurde eine etwas niedrigere Transkription der Gene für ALP, Cadherin 11 und Connexin 43 registriert.

Die verringerte Expression des ALP-Gens (Quotient = -2,63) korrelierte eindeutig mit der 2,19-mal niedrigeren Aktivität dieses Enzyms, die auf der Proteinebene am gleichen Tag registriert wurde (siehe Abb. 3.23C). Die Gene Cadherin 11 und Connexin 43 kodieren transmembrane Proteine, die für die homophile Zelladhäsion und den Aufbau von Zell-Zell-Kontakten zuständig sind (siehe 1.2.2.2). Ein allmählicher Schwund der homophilen Zelladhäsion, d.h. die Abnahme der Cadherin-Synthese, wird sowohl beim Übergang der reifen Osteoblasten in das Stadium von Osteozyten und ihrem Einbau in die ECM als auch während der Apoptose knochenbildender Zellen beobachtet [Manolagas, 2000; Hunter et al., 2001; Marie, 2002]. Cadherine beeinflussen zusammen mit anderen Proteinen der Zelladhäsion auch die Entstehung und die Aufrechterhaltung von Gap junctions [Rundus et al., 1998]. Im konkreten Fall stimmte die Abnahme der Transkription der beiden Gene sowohl mit den insgesamt stärker ausgeprägten apoptotischen Prozessen als auch mit einer wesentlich schneller fortschreitenden osteogenen Differenzierung, die unter serumreduzierten Kultivierungsbedingungen beobachtet wurde, überein.

In der Gruppe der ECM-Proteine war die Transkription der Gene, die Biglycan, Kollagen V und Matrix-Gla-Protein verschlüsseln, signifikant verringert.

Biglycan, ein kleines Proteoglycan der ECM, übt im Knochengewebe mehrere Funktionen aus. Es bindet an Kollagen I-Fibrillen und reguliert dadurch ihre Entstehung und ihren Durchmesser. Eine Zunahme in der Biglycan-Expression wird z.B. auch unmittelbar vor dem Anfang der Mineralisierung beobachtet, was auf seine Rolle bei der Initiierung dieses Prozesses hindeutet. Zudem bildet Biglycan einen inaktiven Komplex mit TGF- $\beta$ -Isoformen aus und reguliert demzufolge die Aktivität dieser Wachstumsfaktoren [Boskey, 1996; Robey, 1996; Blumberg et al., 1997; Boskey & Paschalis, 2000]. Die genaue Ursache der verringerten Transkription des Biglycan-Gens konnte im konkreten Fall jedoch nicht eindeutig aufgeklärt werden. In Zellkulturen, die unter serumreduzierten Konditionen geführt werden, fängt die Mineraleinlagerung viel früher an und ist viel stärker ausgeprägt als in der Positivkontrolle (siehe Abb. 3.23D). Aus diesen Gründen wurde die Biglycan-Expression, die zum Anfang der Mineraleinlagerung, d.h. zum ca. 8. Kultivierungstag, erhöht war, zum Zeitpunkt der RNA-Isolierung wahrscheinlich wieder verringert. Am 17. Tag der Kultivierung wurde aber eine nur tendenzielle Abnahme der Genexpression anderer Nukleatoren (Knochen-Sialoproteins, Osteonectins) registriert. Die reduzierte Transkription des Biglycan-Gens könnte ebenfalls mit der viel niedrigeren Intensität der Kollagen I-Synthese, die in dieser Zeit allerdings nur auf der Proteinebene erfasst wurde, zusammenhängen (siehe Abb. 3.23A). Diese Hypothese bekräftigt auch die signifikant geringere Expression des Kollagen V-Gens. Kollagen V, das nur ca. 3 % der gesamten Kollagen-Matrix formt, ist ähnlich wie Biglycan an der Regulation der Fibrillogenese beteiligt. Es ist bekannt, dass im Knochengewebe die Kollagenfibrillen heterotypisch aufgebaut sind und neben Kollagen I auch einen geringen Anteil von Kollagen V enthalten. Über dieses Mischungsverhältnis wird der Durchmesser der Kollagenfibrillen bestimmt [Eyre, 1996; Minuth et al., 2003].

Matrix-Gla-Protein wird im Knochengewebe nur geringfügig synthetisiert. Am reichlichsten ist es bei Säugetieren im Knorpelgewebe vertreten, wo es vorwiegend von hypertrophen Chondrozyten exprimiert wird [Ducy & Karsenty, 1996]. Dieses nichtkollagenöse Matrixprotein ist ein sehr wirksamer Inhibitor der Mineralisierung und besitzt eine hohe Affinität gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$  und Hydroxylapatit. Zudem bildet Matrix-Gla-Protein zusammen mit Fetuin (α<sub>2</sub>-HS-Glycoproteinen) einen Protein/Mineralkomplex aus, der ebenfalls die Präzipitation, Aggregation und Wachstum der Mineralkristalle unterbindet [Price et al., 2003]. Die niedrigere Expression des Matrix-Gla-Proteins und die viel geringere Konzentration an Fetuin und anderen die Calcifizierung hemmenden Serumproteinen im Medium und demzufolge in der ECM sind womöglich zwei der Faktoren, die für den starken Mineralisierungsgrad der untersuchten Zellkultur verantwortlich waren (siehe Abb. 3.23D). Die etwas niedrigere Transkription des Gens für Matrix-Gla-Protein könnte ferner mit einer kleineren Zahl von hypertrophen Chondrozyten in der vorliegenden Zellkultur und einer

niedrigeren Intensität der BMP-2-Synthese in Verbindung stehen. Es ist bekannt, dass BMPs in der Lage sind die Expression ihrer Antagonisten selbst zu regulieren [Reddi, 2001; Canalis et al., 2003]. Auch Matrix-Gla-Protein gehört zur Gruppe der BMP-Antagonisten. In der Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  kann es z.B. an BMP-2 binden und dadurch die Aktivität dieses äußerst wirksamen Differenzierungsfaktors inhibieren [Sweatt et al., 2003; Wajih et al., 2004].

In der Gruppe von Genen, die Wachstums-, Differenzierungsfaktoren und dazugehörige Rezeptoren kodieren, war die Expression des PDGF- $\beta$ -Rezeptors ( $\beta$ -Polypeptid des PDGF-Rezeptors), des TGF- $\beta$ 2 und der beiden in die Signalübertragung involvierten TGF- $\beta$ -Rezeptoren geringfügig verändert, wobei die Transkription des Typ-I-Rezeptors herabgesetzt, die des Typ-II-Rezeptors dagegen erhöht war. Im Gegensatz zu den Erwartungen zeigte der Expressionsgrad von PDGF-BB und EGF keine Veränderungen auf. Die signifikant verringerte Transkription des Gens für den PDGF- $\beta$ -Rezeptor könnte sowohl mit der extra Zugabe von PDGF-BB als auch mit dem stärker fortgeschrittenen Entwicklungsstadium der Zellen in Verbindung stehen. Da die  $\beta$ -Rezeptoren nur die B-Ketten des PDGF binden können, ist die Reduzierung ihrer Anzahl womöglich eine kompensatorische Reaktion auf die andauernde Einwirkung von PDGF-BB (siehe 1.2.2.4). Auch auf der Zelloberfläche von postmitotischen Osteoblasten und Osteozyten, die im untersuchten serumreduzierten Ansatz am 17. Kultivierungstag deutlich stärker vertreten waren als in der Positivkontrolle (siehe 3.4.2), ist die Zahl dieser Rezeptoren wahrscheinlich geringer.

Die Expressionsmuster der einzelnen TGF- $\beta$ -Isoformen und der TGF- $\beta$ -Rezeptoren sind bei einer In-vitro-Kultivierung osteogener Zellen, besonders humaner Herkunft, noch kaum erforscht. Trotz der Widersprüchlichkeit der publizierten Ergebnisse, ist ihr Expressionsgrad offensichtlich sowohl von dem Entwicklungsstadium der Zellen als auch von den Kultivierungsbedingungen bzw. der Einwirkung anderer Wachstumsfaktoren und Hormone abhängig [Centrella et al., 1995; Centrella et al., 1998; Fagenholz et al., 2001]. Die genauen Ursachen der festgestellten Veränderungen in der Genexpression von TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ -Rezeptoren müssten in weiteren, spezifischeren Experimenten aufgeklärt werden. Fromigué et al. [1998] beschreiben jedenfalls einen mitogenen Effekt, den rhTGF- $\beta$ 2 auf humane osteogene Zellen ausübt. In Experimenten mit osteogenen Rattenzellen hatten Centrella et al. [1995] ähnliche Ergebnisse erzielt. Dabei zeigten die Autoren, dass TGF- $\beta$ 2 die Proliferation der Knochenvorläuferzellen vor ihrer terminalen Differenzierung erhöht und dass die Wirkungsweise der TGF- $\beta$ s offensichtlich über das Verhältnis der einzelnen Rezeptortypen zueinander reguliert wird. Bei einer überwiegenden Expression des Typ-II-Rezeptors induzieren diese Wachstumsfaktoren einen stärker ausgeprägten mitogenen Effekt; bei einer dominierenden Expression des Typ-I-Rezeptors werden vorwiegend die Kollagen-I- und ALP-Synthese gefördert. Es ist daher zu vermuten, dass in der Abschlussphase des intensiven Zellwachstums der erhöhte Expressionsgrad von TGF- $\beta$ 2

mit der ebenfalls erhöhten Expression des Typ-II-Rezeptors in Verbindung steht. Die Expression des Typ-I-Rezeptors ist in dieser Zeit dementsprechend reduziert.

#### **3.4.4 Bewertung der Kultivierung humaner osteogener Zellen in serumreduziertem Medium**

Die Ergebnisse der oben beschriebenen Experimente deuten darauf hin, dass das entwickelte serumreduzierte Medium nicht ohne weiteres einem Medium, das 10 % HS enthält, gleichgestellt werden kann. Das Hauptproblem bei der Kultivierung humaner osteogener Zellen in den verwendeten serumreduzierten Medien lag weniger in den viel stärker ausgeprägten apoptotischen Prozessen sondern vielmehr in dem überhöhten Tempo der Zelldifferenzierung und der damit verbundenen verkürzten Adoleszenz der osteogenen Vorläuferzellen. Die serumreduzierten Medien waren offensichtlich nicht in der Lage einen langfristigeren Erhalt von Osteoprogenitoren zu sichern. Das proliferative Potential der Zellen erschöpfte sich bald und in den betroffenen Zellkulturen wurde relativ schnell ein hoher Anteil an postmitotischen und sekretorisch viel inaktiveren Osteozyten erreicht. Demzufolge war der gesamte Umfang der angelegten ECM einschließlich der nichtkollagenösen Proteine am Ende der Langzeitkultivierung deutlich geringer. Der Mangel an Proteinen, die Präzipitation, Aggregation und Wachstum der Hydroxylapatit-Kristallen inhibieren, verursachte höchstwahrscheinlich den erhöhten Mineralisierungsgrad der betroffenen Zellkulturen. Es muss allerdings erwähnt werden, dass nur ein Teil dieser regulatorischen Substanzen von den osteogenen Zellen selbst produziert wird. Andere in der Knochenmatrix akkumulierte Proteine (z.B. Albumin, Fetuine) sind Serumkomponenten und stammen aus der Blutbahn bzw. aus dem Kulturmedium. In den verwendeten serumreduzierten Medien waren diese Ingredienzien hingegen in einem viel geringeren Ausmaß vorhanden.

Trotz der genannten Nachteile ist es aber durchaus möglich humane primäre Knochenvorläuferzellen über eine begrenzte Zeit unter serumreduzierten Bedingungen z.B. in einem mit 2 % HS, ITA, 5 ng/ml PDGF-BB, 5 ng/ml EGF und osteogenen Supplementen angereicherten  $\alpha$ MEM zu kultivieren. Dieses Kultivierungsverfahren ermöglicht einen ausreichend großen Pool humaner osteogener Vorläuferzellen über einen Zeitraum von ungefähr zwei Wochen aufrechtzuerhalten. Am Ende dieser Periode ist der Gesamtumfang der angelegten Kollagen I-Matrix im Vergleich zu der Positivkontrolle, d.h. zu Zellkulturen, die in einem mit 10 % HS angereicherten Medium geführt wurden, praktisch gleich und der Mineralisierungsgrad der ECM ist nicht exzessiv erhöht (siehe Abb. 3.23).

Die Möglichkeit den Differenzierungsprozess der Zellen nicht nur durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren sondern auch durch den Serumgehalt im Medium zu steuern bildet eine interessante Alternative auch hinsichtlich des Knochen-Tissue-Engineerings. Kuznetsov et al. [2000] haben z.B. gezeigt, dass eine kurze, 3-tägige Vorkultivierung humaner MSC in einem serumfreien Medium die Effizienz der In-vivo-Knochenbildung nach

der Implantation steigern kann. Die Autoren sind allerdings der Meinung, dass das Serum Substanzen enthält, die eine Knochenbildung hemmen und damit eine angemessene Balance zwischen osteogenen und anderen möglichen Differenzierungswegen der MSC gewährleisten. Infolge des Fehlens dieser Inhibitoren kommt es bei einer höheren Anzahl MSC zum osteogenen Differenzierungsprozess, was anschließend zu einer stärker ausgeprägten Knochenbildung führt. Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche zeigen aber auch, dass Serum neben diesen Inhibitoren zweifellos auch solche Bestandteile enthält, die die Expression knochenspezifischer Markerproteine fördern. Eine andauernde Reduzierung der Konzentration dieser Serumkomponenten im Medium hat wiederum eine negative Auswirkung auf die In-vitro-Osteogenese. Eine kurze Kultivierung frisch isolierter humaner MSC zuerst in einem serumreduzierten Medium und danach in einem mit 10 % HS angereicherten Medium könnte womöglich auch die Effizienz der In-vitro-Osteogenese steigern. Es ist denkbar, dass das entwickelte serumreduzierte Medium in künftigen Experimenten durch zusätzliche Supplementierung mit weiteren die Knochenbildung stimulierenden Faktoren wie Zytokine der TGF- $\beta$ -Superfamilie oder Vitamin D<sub>3</sub> noch verbessert werden könnte.

#### **3.4.5 BMP-2 als Supplement zur Verbesserung serumreduzierter Medien**

BMP-2 ist ein sehr wirksamer Regulator der Osteogenese, das die Entwicklung der MSC in die osteogene Richtung fördert. In In-vitro-Kulturen, die mit den aus Knochenmark oder Knochengewebe isolierten Zellen angelegt werden, erhöht es sowohl die Expression des Transkriptionsfaktors Cbfa1/Osf2 als auch die Synthese von Cadherinen und solchen osteogenen Markergenen wie ALP, Knochen-Sialoprotein, Osteocalcin und Decorin (siehe 1.2.2.4). Damit ist es auch erheblich an der Regulation der Matrix-Mineralisierung beteiligt. Die Zugabe von BMP-2 in ein serumreduziertes Medium könnte eventuell die Zell-Zell-Verbindungen stärken, die Effizienz der In-vitro-Osteogenese erhöhen sowie den Verlauf des Mineralisierungsprozesses besser ausbalancieren.

Ein grundlegendes Problem bei der Anwendung dieses sehr potenten Differenzierungsfaktors zur Förderung der Osteogenese ist die exakte Bestimmung der optimalen Konzentration und der Applikationsdauer. Da kommerziell erhältliches rhBMP-2 sehr teuer ist, wird häufig BMP-2 verwendet, das aus verschiedenen nicht gewerblichen Quellen stammt und in unterschiedlichen Expressionssystemen produziert wird (z.B. in CHO-Zellen, Baculovirus-infizierten Insektenzellen, *Escherichia coli*). Demzufolge ist es von sehr unterschiedlicher Qualität und biologischer Aktivität. Ferner ist der Wirkungsgrad dieses Differenzierungsfaktors in hohem Maße von dem verwendeten Zellmaterial bzw. dem Entwicklungsstadium der osteogenen Zellen abhängig. BMP-2 hat einen starken Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung von MSC und frühen Osteoprogenitorzellen. Seine Effizienz nimmt aber mit fortschreitender osteogener

Differenzierung allmählich ab und in reifen Osteoblasten induziert BMP-2 sogar die Apoptose [Lecanda et al., 1997; Haÿ et al., 2001; Wilke et al., 2001]. Aus diesen Gründen können die in der Literatur beschriebenen BMP-2-Konzentrationen nur bedingt für die Durchführung eigener Experimente übernommen werden. In nur 6 Publikationen, die den Einfluss von BMP-2 auf humane osteogene Zellen beschreiben, variiert der Gehalt an rhBMP-2 im Medium zwischen 5 und 100 ng/ml, obwohl es vom gleichen Hersteller (Genetics Institute, Cambridge, MA, USA) bezogen wurde [Lecanda et al., 1997; Fromigué et al., 1998; Haÿ et al., 1999; Haÿ et al., 2001; Locklin et al., 2001; Wilke et al., 2001].

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit sollten sowohl Verfahren zur präzisen Bestimmung der Aktivität von rhBMP-2 weiter entwickelt und verbessert als auch die optimale Dosis dieses Differenzierungsfaktors ermittelt werden. Dabei musste geklärt werden, ob und wie die Kultivierungsbedingungen, z.B. die Kombination von rhBMP-2 mit anderen Wachstumsfaktoren, d.h. PDGF-BB und EGF, oder das verwendete Basalmedium, die osteogene Wirkung von rhBMP-2 beeinflussen.

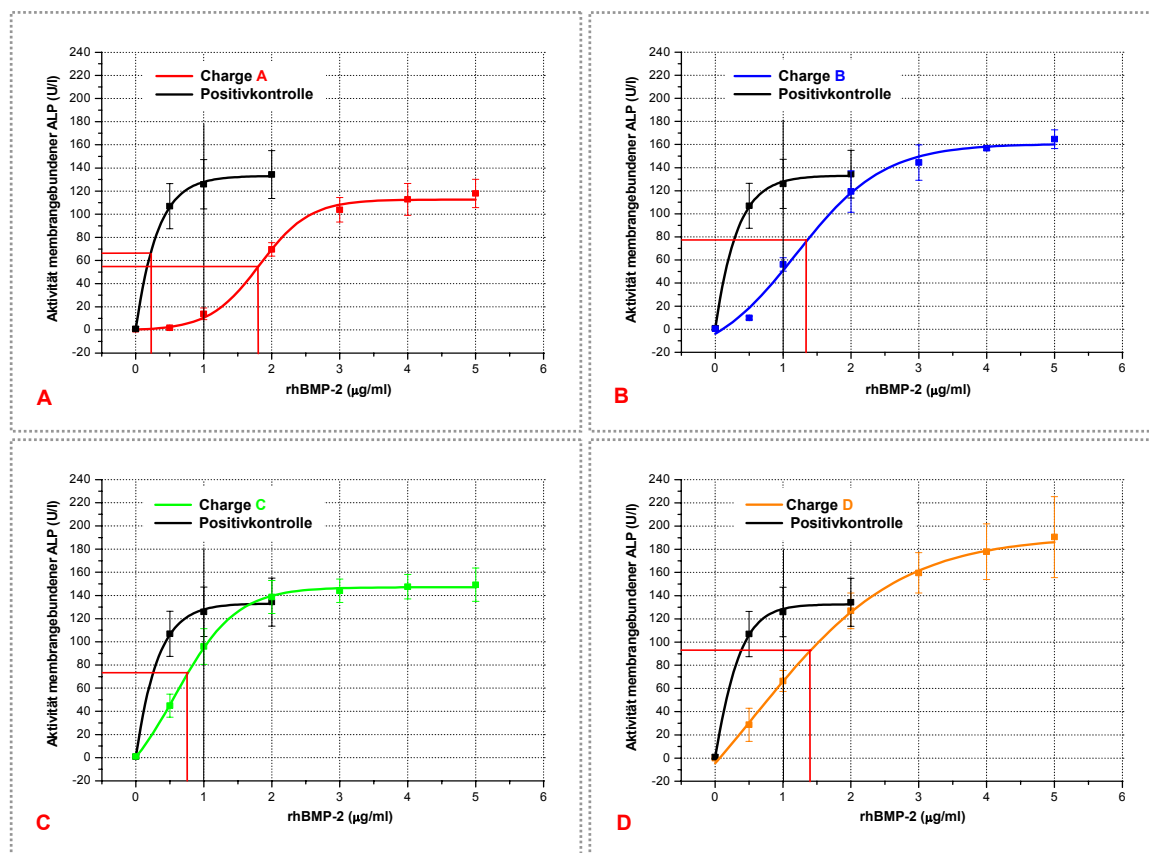
#### **3.4.5.1 Bestimmung der biologischen Aktivität von rhBMP-2 aus verschiedenen Chargen**

Das für die Experimente verwendete rhBMP-2 wurde von L. F. Vallejo und Dr. U. Rinas (GBF) produziert und zur Verfügung gestellt. Alle Chargen dieses rekombinanten osteoinduktiven Faktors wurden nach demselben Verfahren in genetisch modifizierten *Escherichia coli* hergestellt [Vallejo et al., 2002] und in Kulturen der murinen Myoblasten-Zelllinie C2C12 auf ihre biologische Aktivität getestet (siehe 2.2.5). In Abbildung 3.26 werden die Ergebnisse von vier parallel und in je zwei Wiederholungen durchgeführten Tests gezeigt. Dabei wurden alle für diese Untersuchung erforderlichen Zellkulturen, einschließlich der der Positivkontrolle, aus der gleichen Vorkultur angelegt.

Wie eindeutig zu sehen ist, kann die biologische Aktivität des rhBMP-2 in einzelnen Produktionschargen erhebliche Unterschiede aufweisen. Das bedeutet, dass jede Charge des rhBMP-2 auf ihre biologische Aktivität überprüft werden muss, um stark abweichende biologische Aktivitäten ausschließen oder kompensieren zu können.

Ein oft benutzter Parameter zur Beurteilung der biologischen Aktivität eines Zytokins ist die so genannte halbmaximale Dosis ( $ED_{50}$  (Effective Dose 50)). Darunter versteht man diejenige Konzentration eines Zytokins, bei der die Hälfte, d.h. 50 % des maximalen Stimulierungseffekts, im konkreten Falle die Hälfte der maximalen ALP-Aktivität, erreicht wird. Eine weitere Alternative beim Vergleich einzelner rhBMP-2-Chargen stellt die Einführung eines internen Standards dar. Das bedeutet, dass als Positivkontrolle bei jedem Test eine Zellkultur eingesetzt wird, die man mit einem rhBMP-2 bekannter biologischer Aktivität behandelt. In den durchgeführten Tests wurde als Positivkontrolle ein kommerziell erhältliches, von der Firma R&D Systems in CHO-Zellen hergestelltes rhBMP-2 aus

gleicher Charge eingesetzt. Die aus den vier Tests berechneten Werte der erwähnten Parameter sind in der Tabelle 3.8 dargestellt.



**Abb. 3.26**

Ergebnisse der Aktivitätstests zur Bestimmung der biologischen Aktivität von rhBMP-2 aus den vier Chargen – A, B, C, D. Das zu überprüfende rhBMP-2 wurde in transfizierten *Escherichia coli* produziert. Als Positivkontrolle wurde in CHO-Zellen hergestelltes rhBMP-2 (R&D Systems) eingesetzt. Die roten Linien zeigen die halbmaximale ALP-Aktivität und die ED<sub>50</sub>. Die schwarze Linie markiert die Konzentration von rhBMP-2, bei welcher das Verhältnis zwischen der ALP-Aktivität in der Positivkontrolle und in der jeweils getesteten rhBMP-2-Charge berechnet wurde.

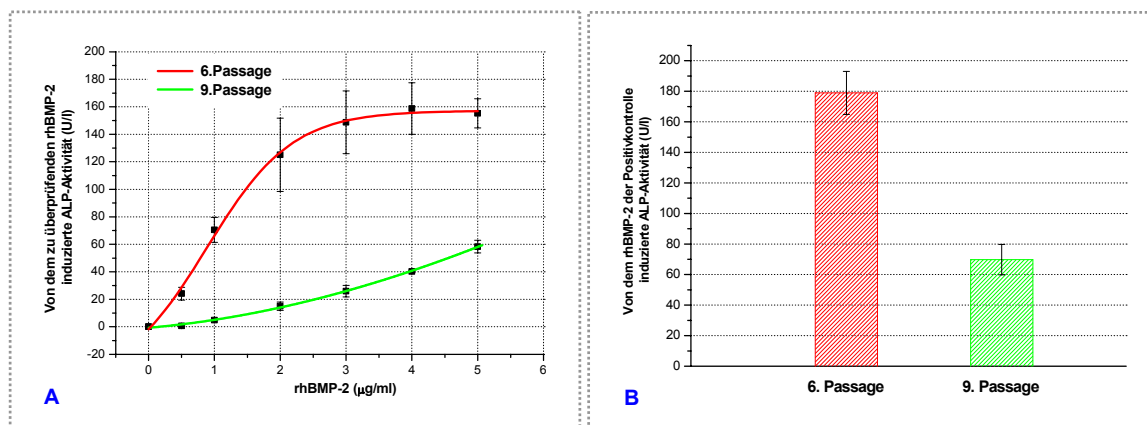
**Tabelle 3.8**

**ED<sub>50</sub> und relative Aktivität von rhBMP-2 in vier getesteten Chargen**

Charge	ED <sub>50</sub> µg/ml rhBMP-2	Aktivität membrangebundener ALP nach der Stimulation mit 1 µg/ml rhBMP-2	
		U/l	% im Vergleich zu Positivkontrolle
Positivkontrolle	0,21	128,2	100,0
A	1,83	11,1	8,7
B	1,38	52,3	40,8
C	0,75	96,3	75,1
D	1,40	67,3	52,5

Wie aus der Abbildung 3.26 ersichtlich, erfolgte der Anstieg der ALP-Aktivität in den als Positivkontrolle mitgeführten Zellkulturen viel schneller. Das bedeutet, dass das in Säugetierzellen (CHO-Zellen) hergestellte rhBMP-2 eine erheblich höhere Affinität gegenüber den BMP-2-Rezeptoren als das in *Escherichia coli* produzierte BMP-2 besitzt.



**Abb. 3.27**

**Ergebnisse von zwei Testverfahren zur Bestimmung der biologischen Aktivität von rhBMP-2.** Für die Tests wurde in *Escherichia coli* hergestelltes rhBMP-2 der gleichen Charge (A) und in CHO-Zellen produziertes rhBMP-2 (R&D Systems) in der Konzentration von 1 µg/ml (B) verwendet. Für das erste Testverfahren wurden die C2C12-Zellen der 6. Passage, für das zweite die Zellen der 9. Passage verwendet.

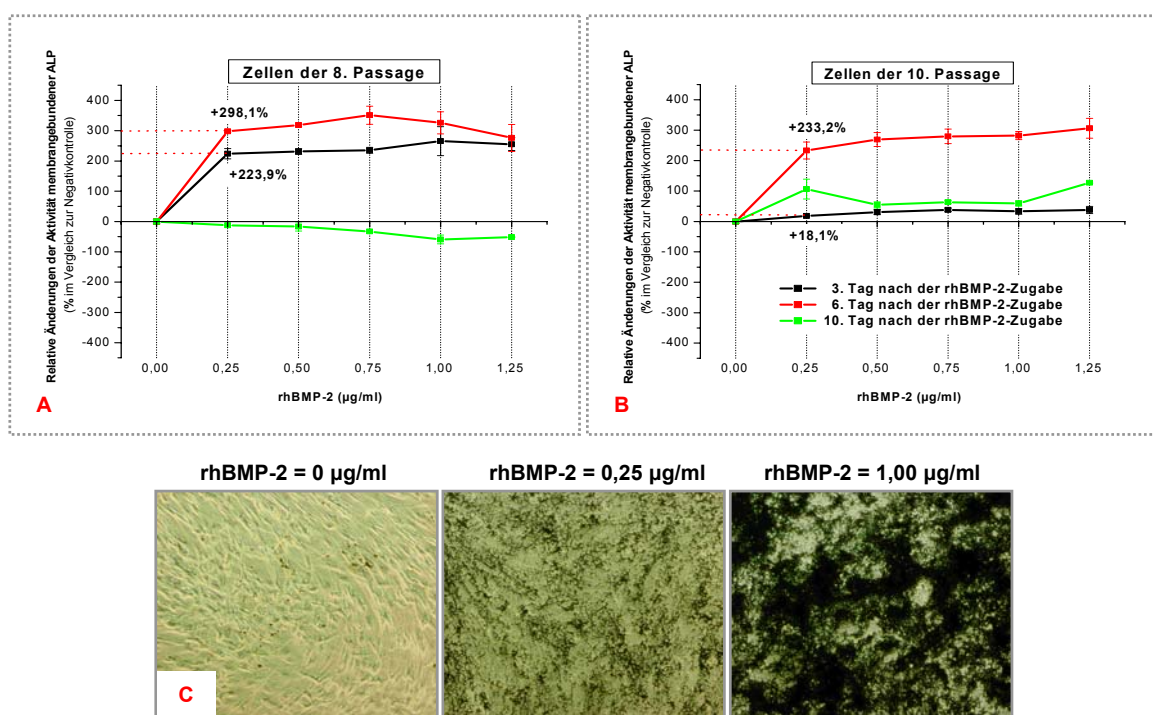
Ein weiteres Optimierungsexperiment zeigte (Abb. 3.27), dass es bei der Durchführung der Aktivitätsbestimmung äußerst wichtig ist möglichst gleiches Zellmaterial zu verwenden. Die C2C12-Zellen wurden nach dem Erhalt bis zur 4. Passage (die Passage, in der die Zellen angeliefert wurden, wurde laborintern als 0. Passage definiert) in einem mit 10 % FBS und Antibiotikum angereicherten DMEM vermehrt und dann kryokonserviert. Unmittelbar vor dem Testverfahren wurden die Zellen revitalisiert und dann über eine oder vier Passagen unter den gleichen Bedingungen weiter kultiviert (siehe auch 2.2.5). Zellen der 6. Passage wurden für das erste, Zellen der 9. Passage für das zweite Testverfahren eingesetzt. Wie eindeutig zu sehen ist, reagierten die Zellen der 6. Passage auf die Einwirkung beider verwendeten rhBMP-2 viel empfindlicher als diejenigen Zellen, die aus einer späteren Passage stammten. Das Ergebnis der Tests wird demgemäß durch zwei Faktoren beeinflusst, d.h. durch die biologische Aktivität des rhBMP-2 und durch das Differenzierungsstadium der Zellen bzw. dem Expressionsgrad der BMP-2-bindenden Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Bei der Durchführung der Aktivitätstests wurden deshalb immer nur C2C12-Zellen der 6. Passage verwendet.

#### 3.4.5.2 Bestimmung einer für die Kultivierung humaner osteogener Zellen geeigneten rhBMP-2-Konzentration

Für die Tests zur Ermittlung einer für die Kultivierung humaner osteogener Zellen geeigneten rhBMP-2-Konzentration wurde rhBMP-2 der Charge D und das aus einer heterotopen Ossifikation isolierte Zellmaterial verwendet. Die Zellen wurden in der 6. Passage revitalisiert und dann über eine oder drei Passagen in einem mit 10 % HS und osteogenen Supplementen angereicherten ZKT-I-Medium expandiert. Beim Übergang in die 8. bzw. 10. Passage wurden die osteogenen Zellen in mit 1%iger Gelatine beschichteten 48-Loch-Platten, in  $\alpha$ MEM (Experiment 1) oder  $\alpha$ MEM und ZKT-I-Medium (Experiment 2) ausgesät. Beide Medien wurden mit 10 % HS und osteogenen

Supplementen angereichert. Die anfängliche Zelldichte in allen Kulturgefäßen entsprach  $1,2 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>. Danach wurden die Zellen bis zur Konfluenz unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Am Tag der Konfluenz (5. Kultivierungstag) wurde die Zellschicht einmal mit warmer PBS (37 °C) gewaschen und danach das jeweilige Medium durch ein serumreduziertes, d.h. entweder ein mit 2 % HS, ITA, osteogenen Supplementen oder ein mit 2% HS, ITA, osteogenen Supplementen und 10 ng/ml PDGF-BB, 10 ng/ml EGF angereichertes Medium ersetzt. Dabei wurden die serumreduzierten Medien noch zusätzlich mit rhBMP-2 in unterschiedlichen Konzentrationen ergänzt. Als Negativkontrolle dienten Zellkulturen, die in dem entsprechenden serumreduzierten Medium ohne BMP-2-Zugabe mitgeführt wurden.

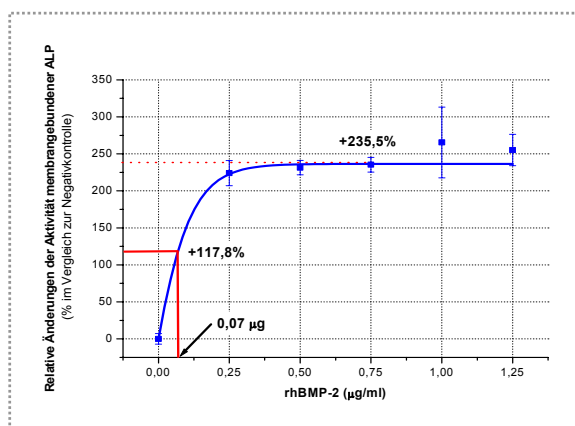
Beim ersten Experiment wurden die humanen osteogenen Zellen ab dem Tag der Konfluenz in serumreduziertem  $\alpha$ MEM ohne die Zugabe von Wachstumsfaktoren kultiviert. In das serumreduzierte Medium wurde dafür so viel rhBMP-2 zugegeben, dass dessen Endkonzentration im Medium 0,25, 0,50, 0,75, 1,00 und 1,25  $\mu$ g/ml entsprach. Der Medienwechsel wurde zweimal in der Woche vorgenommen. Am 3., 6. und 10. Tag nach der Zugabe von rhBMP-2 wurden die Veränderungen in der Aktivität membrangebundener ALP im Vergleich zur Negativkontrolle erfasst; am 10. Tag wurde zudem eine Von-Kossa-Färbung durchgeführt.



**Abb. 3.28**

Bestimmung einer für die Kultivierung humaner osteogener Zellen geeigneten rhBMP-2-Konzentration. Änderungen in der ALP-Aktivität (im Vergleich zur Negativkontrolle) wurden nach der Zugabe von rhBMP-2 der Charge D ermittelt. Die Kulturen wurden mit Zellen der 8. Passage (A) oder der 10. Passage (B) angelegt; C - Von-Kossa-Färbung (Nachweis der Mineralisierung), die am 10. Tag nach der Zugabe von rhBMP-2 in Zellkulturen der 8. Passage durchgeführt wurde.

Wie in Abbildung 3.28 zu sehen ist, löste die Zugabe des rhBMP-2 in den betroffenen Zellkulturen zunächst, d.h. bis zum 6. Wirkungstag, eine deutliche Zunahme der ALP-Aktivität aus. Der maximale Effekt wurde bei einer rhBMP-2-Konzentration von ca. 0,75 µg/ml erreicht. Dabei reagierten die primären osteogenen Humanzellen auf rhBMP-2 wesentlich empfindlicher als die murinen Zellen der C2C12-Zelllinie. Nach gleicher, d.h. 3 Tage andauernden Einwirkung von rhBMP-2 der Charge D entsprach der ED<sub>50</sub>-Wert in humanen Kulturen 0,07 µg/ml (Abb. 3.29), in den Kulturen der C2C12-Zelllinie hingegen 1,40 µg/ml (siehe Tab. 3.8).



**Abb. 3.29**

Bestimmung der ED<sub>50</sub> von rhBMP-2 in den Zellkulturen, die mit humanen osteogenen Zellen der 8. Passage angelegt wurden. Die Kurve wurde am 3. Tag nach der rhBMP-2-Zugabe (Charge D) aufgenommen.

Aus Abbildung 3.28 ist ebenfalls ersichtlich, dass die Zugabe von rhBMP-2 den Differenzierungsprozess osteogener Zellen wesentlich beschleunigte, wobei dieser Effekt erkennbar vom Differenzierungsstadium der Zellen abhängig war. In Zellkulturen der 8. Passage löste z.B. schon eine 3-tägige Einwirkung von rhBMP-2 in einer Konzentration von 0,25 µg/ml eine starke, 223,9%ige Erhöhung (im Vergleich zu der Negativkontrolle) der ALP-Aktivität aus. In den Kulturen der 10. Passage war der Anstieg der ALP-Aktivität deutlich geringer und entsprach lediglich 18,1 %. Am 6. Tag nach der rhBMP-2-Zugabe war diese Differenz allerdings weniger stark ausgeprägt, d.h. bei derselben, oben genannten rhBMP-2-Konzentration entsprach die Zunahme der ALP-Aktivität in den Zellkulturen der 8. Passage 298,1 %, in denen der 10. Passage 233,2 %. Nach 10 Tagen wurde in allen mit rhBMP-2 behandelten Zellkulturen eine deutliche Reduzierung der ALP-Aktivität registriert, was auf einen zunehmenden Anteil von ALP-negativen Osteozyten hindeutete. Dabei nahm die ALP-Aktivität in Kulturen der 8. Passage ebenfalls viel deutlicher ab als in Zellkulturen der 10. Passage.

Die Ergebnisse des durchgeführten Experiments zeigen daher, dass auch während der Vorkultivierung und trotz des ausbleibenden konfluenten Zustands die Ausdifferenzierung humaner osteogener Zellen ziemlich zügig weiter verläuft und dass die Effizienz der rhBMP-2-Wirkung vom Differenzierungsstadium bzw. der Anzahl früher Progenitorzellen in der vorliegenden Zellkultur abhängig ist. Die gewonnenen Erkenntnisse stimmten damit mit Literaturangaben überein, welche darauf hinweisen, dass gerade in frühen

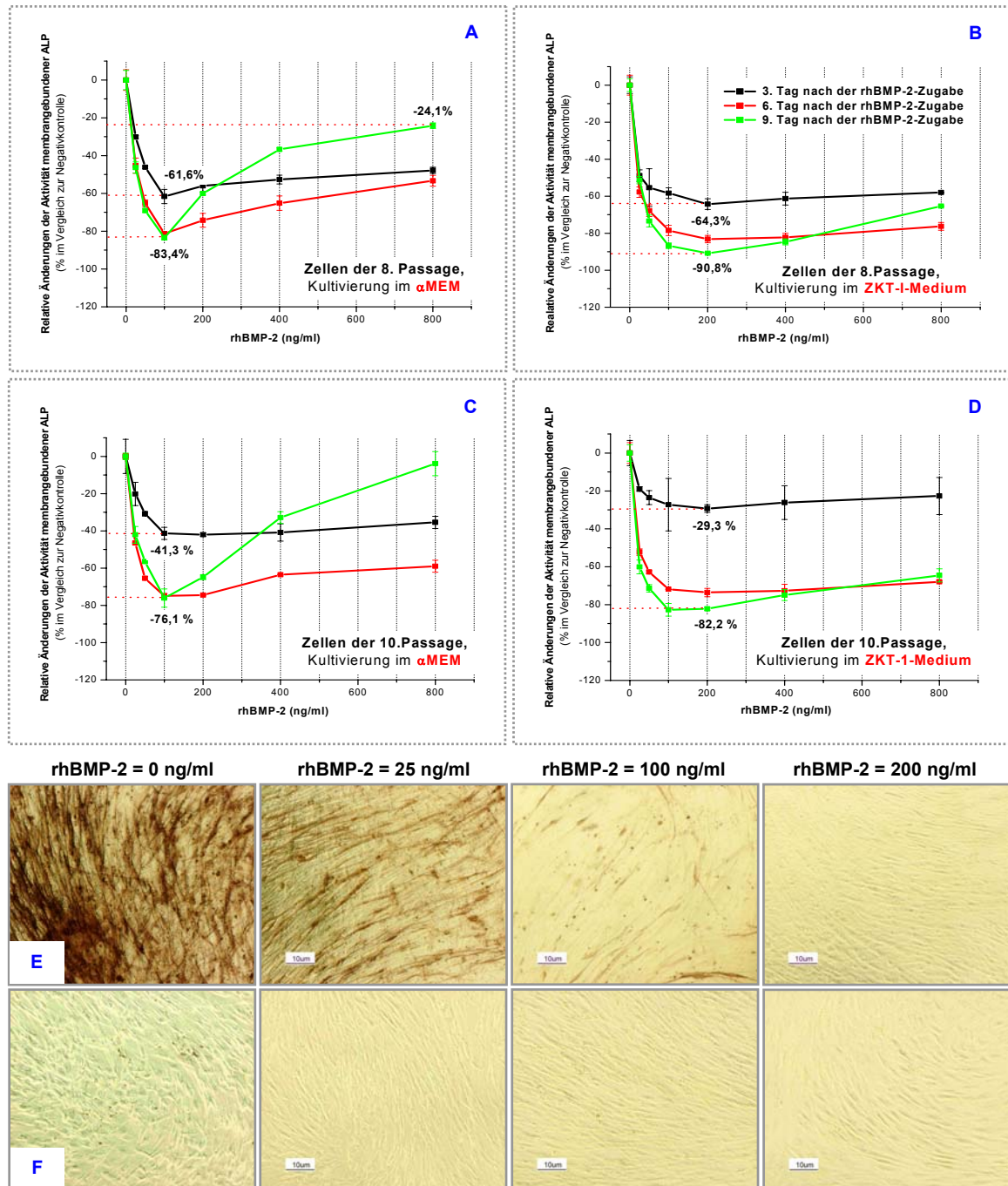
Entwicklungsstadien befindliche Knochenvorläuferzellen auf die Einwirkung von BMP-2 am stärksten reagieren [Lecanda et al., 1997; Haÿ et al., 1999].

Eine am 10. Wirkungstag durchgeführte Von-Kossa-Färbung zeigte zudem, dass die verstärkte Mineralisierung der ECM, die eindeutig durch rhBMP-2 induziert wurde (siehe Abb. 3.28C), nicht nur mit der Zunahme der ALP-Aktivität in Verbindung steht. So wies der Mineralisierungsgrad zwischen Zellkulturen der 8. Passage, die mit 0,25 µg/ml und 1,00 µg/ml rhBMP-2 behandelt wurden, einen deutlichen Unterschied auf, obwohl die Differenzen in der ALP-Aktivität über den gesamten Zeitraum des Experiments vergleichsweise gering blieben. Lecanda et al. [1997] haben bei ihren Untersuchungen festgestellt, dass bei der Differenzierung humaner primärer Knochenvorläuferzellen unter der Einwirkung von rhBMP-2, die Expression von solchen nichtkollagenösen Matrixproteinen wie Knochen-Sialoprotein, Decorin, Osteopontin und Osteocalcin gefördert wird. Es ist denkbar, dass Unterschiede in dem Expressionsgrad von Knochen-Sialoprotein, eines der wichtigsten Nukleatoren bei der Initiierung der Mineraleinlagerung, die Differenzen in dem Mineralisierungsgrad untersuchter Zellkulturen mit verursachen. Im Gegensatz zu ALP könnte die Zunahme im Expressionsgrad dieses nichtkollagenösen Proteins in der Abhängigkeit von der rhBMP-2-Konzentration langsamer erfolgen. Damit würde der maximale Effekt, d.h. der maximale Mineralisierungsgrad bei einer höheren BMP-2-Konzentration erreicht. Zur Bestätigung dieser Hypothese müssten jedoch weitere Versuche durchgeführt werden, in denen die zeitabhängigen Veränderungen in der Expression nichtkollagenöser Proteine unter rhBMP-2-Einfluss ausführlich untersucht werden.

Beim zweiten Experiment sollte geklärt werden, in welchem Maße die Wachstumsfaktoren PDGF-BB, EGF und das Basalmedium die von rhBMP-2 induzierten Effekte beeinträchtigen. Dazu wurden die humanen osteogenen Zellen ab dem Tag der Konfluenz in serumreduziertem  $\alpha$ MEM oder ZKT-I-Medium, die mit den genannten Wachstumsfaktoren in einer Konzentration von 10 ng/ml und rhBMP-2 der Charge D supplementiert wurden, kultiviert. Die Endkonzentration des rhBMP-2 in den Medien entsprach dabei 25, 50, 100, 200, 400 und 800 ng/ml, d.h. in diesem Experiment wurde der analysierte Konzentrationsbereich des rhBMP-2 noch weiter eingengt. Der Medienwechsel wurde zweimal in der Woche vorgenommen. Am 3., 6. und 9. Tag nach der Zugabe von rhBMP-2 wurden die Veränderungen in der Aktivität membrangebundener ALP im Vergleich zur Negativkontrolle registriert; am 9. Tag wurde zudem eine ALP- und Von-Kossa-Färbung durchgeführt.

Wie aus Abbildung 3.30 ersichtlich, lieferte das 2. Experiment ganz unerwartete Ergebnisse. Im Gegensatz zum ersten Experiment, in dem das serumreduzierte Medium nur mit rhBMP-2 angereichert wurde, rief die Kombination dieses Differenzierungsfaktors mit den Wachstumsfaktoren PDGF-BB und EGF eine völlig entgegengesetzte Reaktion

hervor. Auch am Ende des Experiments lieferte die Von-Kossa-Färbung in keiner der mit rhBMP-2 behandelten Zellkulturen ein positives Ergebnis (Abb. 3.30F) und schon nach drei Tagen der rhBMP-2-Wirkung wurde sowohl auf biochemischer als auch histologischer Ebene (Abb. 3.30E) eine deutliche Reduzierung der ALP-Aktivität registriert.



**Abb. 3.30**

Bestimmung einer für die Kultivierung humaner osteogener Zellen geeigneten rhBMP-2-Konzentration. Änderungen in der ALP-Aktivität (im Vergleich zur Negativkontrolle) wurden nach der Zugabe von rhBMP-2 der Charge D in Zellkulturen, die mit den Zellen der 8. Passage (A, B) oder 10. Passage (C, D) angelegt wurden, ermittelt. Als Basismedium wurde entweder ein serumreduziertes, mit 2 % HS, ITA, 10 ng/ml PDGF-BB, 10 ng/ml EGF und osteogenen Supplementen angereichertes  $\alpha$ MED oder ZKT-1-Medium eingesetzt. E - ALP-Färbung, die am 9. Tag nach der Zugabe von rhBMP-2 in Zellkulturen der 8. Passage (Kultivierung in ZKT-1-Medium) durchgeführt wurde; F - Von-Kossa-Färbung (Nachweis der Mineralisierung), die in Zellkulturen der 8. Passage (Kultivierung in  $\alpha$ MED) durchgeführt wurde.

Der maximale Effekt wurde allerdings später als im ersten Experiment, d.h. erst am 9. Wirkungstag und bei einer wesentlich niedrigeren Konzentration von rhBMP-2 erreicht. Das Ausmaß des erreichten Effekts war dabei nicht nur von der rhBMP-2-Konzentration, der Einwirkungsdauer und dem Entwicklungsstadium der Zellen sondern auch von dem verwendeten Basalmedium abhängig.

Bei der Kultivierung in einem serumreduzierten  $\alpha$ MEM wurde die stärkste Abnahme der ALP-Aktivität bei einer rhBMP-2-Konzentration von 100 ng/ml erreicht. Interessant war auch, dass nach einer 6 Tage langen Einwirkung des rhBMP-2 bei Konzentrationen über 100 ng/ml eine erkennbare bis starke Verringerung des erreichten Effekts beobachtet wurde. Bei einem rhBMP-2-Gehalt von 100 ng/ml war die ALP-Aktivität z.B. in Zellkulturen der 8. Passage am 9. Wirkungstag um 83,4 % geringer, bei einem rhBMP-2-Gehalt von 800 ng/ml nur noch um 24,1 % geringer als in der Negativkontrolle (Abb. 3.30A). Bei der Kultivierung in ZKT-I-Medium wurde die maximale Reaktion bei einer rhBMP-2-Konzentration von 200 ng/ml erzielt. Die Reduzierung des erreichten Effekts im Konzentrationsbereich über 200 ng/ml war dabei schwächer ausgeprägt und erst am 9. Tag nach der rhBMP-2-Zugabe eindeutig erkennbar. Gleich wie beim ersten Experiment war das Ausmaß der erzielten Effekte vom Entwicklungsstadium der osteogenen Zellen abhängig, wenn auch in einem geringeren Maße. Sowohl bei der Kultivierung in serumreduziertem  $\alpha$ MEM als auch in serumreduziertem ZKT-I-Medium wurde in Kulturen, die aus den Zellen der 10. Passage angelegt wurden, eine geringere Abnahme der ALP-Aktivität registriert. Dieser Unterschied war besonders deutlich beim Vergleich der am 3. Tag nach der rhBMP-2-Zugabe erreichten Wirkungseffekte (Abb. 3.30B, 3.30D).

Die Ergebnisse des zweiten Experiments geben damit einen interessanten Anreiz für zukünftige Experimente. Um die gewonnenen Daten eindeutig interpretieren zu können, müsste zuerst geklärt werden, wie die Kombination von rhBMP-2 mit PDGF-BB und EGF die Proliferation, die Vitalität, die Expression der entsprechenden Rezeptoren, der BMP-Antagonisten und anderer knochenspezifischer Marker (außer ALP) sowie den Mineralisierungsprozess der ECM beeinflusst. Die erforderlichen Daten könnten dabei die Microarray-Analyse der Genexpression sowie eine ausführliche biochemische Untersuchung der osteogenen Zellen während einer Langzeitkultivierung liefern. Ohne diese zusätzlichen Informationen ist es nicht möglich rhBMP-2 zur Verbesserung des entwickelten serumreduzierten Mediums einzusetzen. Die Verwendung von rhBMP-2 als alleinigen Faktor zur Beschleunigung der osteogenen Differenzierung, die bei einer serumreduzierten Kultivierung ohnehin schon hoch ist, wäre gewiss nicht sinnvoll.

In den beiden mit primären osteogenen Zellen durchgeführten Experimenten konnte jedoch gezeigt werden, dass eine 6 Tage andauernde Behandlung des verwendeten Zellmaterials mit 100 ng/ml des rhBMP-2 der Charge D ausreicht, um einen maximalen bzw. einen dem Maximum nahen Wirkungseffekt zu erzielen. Die gewonnen Ergebnisse verdeutlichen



außerdem, dass die von rhBMP-2 hervorgerufenen Effekte nicht nur von der Konzentration und Wirkungsdauer dieses osteoinduktiven Faktors, die in einem oder mehreren Vorversuchen präzise zu bestimmen sind, sondern auch vom Differenzierungsstadium der Knochenzellen, von der Präsenz anderer Zytokine bzw. weiterer Wachstumsfaktoren und vom verwendeten Basalmedium stark beeinflusst werden. Die letzten drei Punkte sind in den Experimenten mit rhBMP-2 und beim Vergleich von Ergebnissen, die aus unterschiedlichen Experimenten stammen, unbedingt zu beachten.

Die Wechselwirkung zwischen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren ist zweifellos ein interessantes Thema, das bis jetzt nur wenig erforscht ist. Die Literaturrecherche lieferte nur spärliche Andeutungen, dass eine gleichzeitige Anwendung von BMP-2 und Wachstumsfaktoren zu keinem synergistischen oder additiven Effekt führt. Die beiden Gruppen der Zytokine wirken eher antagonistisch und können ihre Aktivität sogar gegenseitig aufheben [Wozney, 2002]. So waren z.B. die in Kulturen humaner MSC erzielten Effekte bei einer gleichzeitigen langfristigen Anwendung von TGF- $\beta$ 2 und BMP-2 eindeutig schwächer als dann, wenn diese Faktoren separat oder nacheinander, d.h. zuerst TGF- $\beta$ 2 (fördert die Proliferation der Zellen und die Kollagen I-Synthese) und danach BMP-2 (fördert die ALP-Expression und die Mineralisierung der ECM) eingesetzt wurden [Fromigüé et al., 1998].

Die Mechanismen dieser Wechselwirkungen sind allerdings noch nicht aufgeklärt und könnten z.B. mit der gegenseitigen Unterdrückung der Expression zugehöriger Rezeptoren verbunden sein. Während der Osteogenese werden die Wachstums- und Differenzierungsfaktoren bzw. BMPs wahrscheinlich in einer bestimmten zeitlichen Reihenfolge exprimiert [Wozney, 2002]. In weiteren Experimenten könnte daher auch überprüft werden, wie eine zeitlich versetzte Anwendung von Wachstumsfaktoren und BMP-2 die Effizienz der In-vitro-Osteogenese beeinflusst.

### **3.5 Möglichkeiten der Steuerung von Proliferation und Differenzierung humaner Knochenvorläuferzellen und ihre potentiellen Anwendungen im Kontext des Knochen-Tissue-Engineerings**

Die in vorhergehenden Kapiteln beschriebenen Experimente zur Optimierung der In-vitro-Kultivierung humaner osteogener Zellen zeigen, dass die Proliferation und insbesondere die Geschwindigkeit, mit der die Knochenvorläuferzellen ausdifferenzieren und in das terminale d.h. osteozytäre Differenzierungsstadium übergehen, von mehreren Faktoren beeinflusst werden. Diese Faktoren können im Kontext des Knochen-Tissue-Engineerings zur Steuerung des Differenzierungsprozesses humaner Knochenvorläuferzellen eingesetzt werden.

Das verwendete Basalmedium ist zweifellos ein wichtiger Faktor, der im Rahmen des Knochen-Tissue-Engineerings unbedingt zu berücksichtigen ist. Schon durch die Wahl des einen oder des anderen Basalmediums können Proliferation und Differenzierung

osteogener Zellen stark beeinflusst werden (siehe 3.1.5). So wird z.B. in dem vergleichsweise weniger komplexen DMEM mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt von 1,8 mmol/l ein geringeres Wachstum, dafür aber eine sehr schnelle Ausdifferenzierung humaner osteogener Zellen und ein hoher Mineralisierungsgrad der ECM erreicht. Die Verwendung der reichhaltigeren Medien RPMI 1640 und ZKT-I, die eine viel niedrigere  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von nur 0,42 mmol/l bzw. 0,89 mmol/l aufweisen, gewährleistet im Gegensatz dazu eine bessere Zellproliferation, führt aber zu einer deutlich langsameren Ausdifferenzierung der humanen Knochenvorläuferzellen und zu einer viel schwächeren Matrix-Mineralisierung. Für eine Langzeitkultivierung humaner osteogener Zellen ist bestimmt  $\alpha$ MEM am besten geeignet. In diesem Medium mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt von 1,8 mmol/l werden sowohl ein gutes Wachstum als auch eine nicht zu schnelle Ausdifferenzierung der humanen Knochenvorläuferzellen bei ausreichend hohem Mineralisierungsgrad der ECM erzielt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei der Kultivierung osteogener Zellen neben der  $\text{P}_i$ - auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Medium eine sehr wichtige Rolle spielt. Sie beeinflusst besonders stark die Mineralisierung der ECM und offensichtlich in hohem Maße auch die Differenzierungsgeschwindigkeit der Knochenvorläuferzellen, die in Medien mit niedrigem Calcium-Gehalt, wie schon erwähnt, eindeutig geringer ist. Bei einem gleich bleibenden  $\text{P}_i$ -Gehalt ist es möglich durch die Erhöhung oder Verringerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Medium den Verlauf des Mineralisierungsprozesses bzw. den Zeitpunkt des Beginns der Mineraleinlagerung sowie den Mineralisierungsgrad der ECM zu beeinflussen (siehe 3.1.3).

Für die Anwendungen des Knochen-Tissue-Engineerings ist, wie die durchgeführten Experimente belegen, allerdings von Vorteil zwei unterschiedliche Basalmedien nacheinander einzusetzen (siehe 3.2). Für die zumeist benötigte Subkultivierung, d.h. die Vermehrung der frisch isolierten osteogenen Zellen könnte so zuerst ein Proliferationsmedium, z.B. ZKT-I, das die Differenzierung der Knochenvorläuferzellen verlangsamt, verwendet werden. Dadurch wird in der vorliegenden Zellkultur der Erhalt einer größeren Anzahl an frühen Progenitorzellen gesichert, welche später, d.h. nach der Besiedlung der 3D-Trägergerüste und dem Übergang zu einer Kultivierung in einem Differenzierungsmedium, beispielsweise  $\alpha$ MEM oder ZKT-I-Medium mit einem nachträglich erhöhten Calcium-Gehalt, eine effizientere Knochenbildung garantiert.

Eine weitere Möglichkeit zur Steuerung des Differenzierungsprozesses bietet die Reduzierung des Serumgehalts im Medium. So führt etwa die Verwendung des im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten serumreduzierten Mediums, das mit 2 % HS, ITA, 5 ng/ml PDGF-BB und 5 ng/ml EGF angereichert wird, zu einer rapiden Erhöhung der Anzahl von synthetisch besonders aktiven Präosteoblasten und Osteoblasten und demzufolge zu einem schnelleren Anstieg der Kollagen I-Produktion, der ALP-Aktivität und



zu einer früheren Einleitung der Mineraleinlagerung (siehe 3.4.2). Eine temporäre Kultivierung der besiedelten Trägergerüste in einem serumreduzierten Medium unmittelbar vor ihrer Implantation könnte danach die Effizienz der In-vivo-Osteogenese erhöhen. Es muss allerdings beachtet werden, dass humane primäre osteogene Zellen auf eine Verringerung des Serumanteils im Medium bzw. auf den Entzug von Wachstumsfaktoren offensichtlich viel empfindlicher reagieren als z.B. primäre Knochenvorläuferzellen der Ratte (siehe 3.4). Demzufolge ist die Kultivierung humaner osteogener Zellen in dem entwickelten serumreduzierten Medium nur über einen beschränkten Zeitraum von maximal 2 Wochen und unter kontinuierlicher Zugabe von Wachstumsfaktoren möglich (siehe 3.4.4). Die Verringerung des Serumgehalts unter die 2 % Grenze ist bei der Kultivierung humaner Osteoprogenitoren nicht zweckmäßig, weil sie zu einer viel zu schnellen Ausdifferenzierung der Vorläuferzellen und zu einer deutlichen Minderung der Kollagen I- und ALP-Expression führt. Wegen der erhöhten Geschwindigkeit der Zelldifferenzierung ist das entwickelte serumreduzierte Kultivierungsverfahren für die Expansion der isolierten humanen Knochenvorläuferzellen offensichtlich nicht geeignet.

BMP-2, welches oft zur Einleitung und Beschleunigung der osteogenen Differenzierung eingesetzt wird, kann in einem In-vitro-Kultivierungssystem nur unter Berücksichtigung bestimmter Voraussetzungen angewendet werden. Der Wirkungsgrad dieses sehr potenten osteoinduktiven Faktors ist z.B. im hohen Maße vom Entwicklungsstadium der osteogenen Zellen abhängig. Deshalb ist der Einsatz von BMP-2 nur bei einem Zellmaterial, das einen ausreichend hohen Anteil von induzierbaren d.h. multipotenten MSC sowie von Osteoprogenitoren in frühen Entwicklungsstadien beherbergt, sinnvoll. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente haben ebenfalls gezeigt, dass eine gleichzeitige Anwendung von BMP-2 und von Wachstumsfaktoren zu einer der allgemein bekannten BMP-2-Wirkung entgegengesetzten Reaktion führt. In weiteren Experimenten müsste daher nicht nur der Mechanismus dieser Wechselwirkung sondern auch die zeitliche Abfolge und die Bedingungen, unter welchen die Wachstumsfaktoren und der osteoinduktive Faktor BMP-2 bei der Kultivierung humaner knochenbildenden Zellen einzusetzen sind, detailliert geklärt werden. Am effektivsten könnte BMP-2 womöglich in der Phase der Zellvermehrung angewendet werden, um vor der Besiedlung der Trägergerüste den Anteil an osteogenen Zellen im Zellmaterial, das aus Knochenmark oder anderen Gewebetypen (z.B. aus Fett-, Muskel- oder perivaskulärem Gewebe) isoliert wurde, zu steigern.

Die Möglichkeiten über die verschiedenen Kultivierungsverfahren und die Zusammensetzung des Kulturmediums Einfluss auf Proliferation und Differenzierung osteogener Zellen zu nehmen sind daher noch nicht ausgeschöpft. Sie könnten künftig weiter verbessert und ausgebaut werden und z.B. auf einer zeitabhängigen Zugabe von Zytokinen, Hormonen, Mineralien und Vitaminen basieren.

### 3.6 Auswahl analytischer Methoden zum umfangreichen Monitoring von Proliferation und Differenzierung humaner osteogener Zellen

#### 3.6.1 Invasive und nicht-invasive analytische Methoden

Einen wichtigen Aspekt bei der reproduzierbaren Herstellung intakter humaner Knochenimplantate stellt zweifellos ein informatives, umfangreiches und sicheres Monitoring dieses Prozesses dar. Eine der wichtigsten Aufgaben der vorliegenden Arbeit war daher die Zusammenstellung einer Auswahl von Analysetechniken, die den gesamten Verlauf der Osteogenese d.h. den Status der Zellentwicklung zuverlässig widerspiegelt und die anschließend bei der Herstellung humaner 3D-Knochenimplantate eingesetzt werden könnte. Diese Aufgabenstellung erforderte die Etablierung, Anpassung und Entwicklung eines relativ breiten Spektrums an biochemischen, immunologischen, molekularbiologischen und histologischen Analysemethoden, welche zunächst bei den Experimenten mit humanen osteogenen Zellen in 2D-Kulturen auf ihre Informativität und Verlässlichkeit getestet wurden. Der Schwerpunkt bei der Auswahl geeigneter Analysemethoden wurde auf nicht-invasive Verfahren gelegt. Im Gegensatz zu invasiven Techniken, deren Durchführung mit einer irreversiblen Zerstörung der vorliegenden Zellkultur verbunden ist, analysieren die nicht-invasiven Methoden die im Kulturmedium gelösten oder von den osteogenen Zellen in den Kulturüberstand abgesonderten löslichen Substanzen (siehe Tab. 3.9). So bleibt die zu überwachende Zellpopulation über den ganzen Zeitraum des Experiments intakt. Diese Analysemethoden sind deswegen sowohl zur Überwachung osteogener 2D-Langzeitkulturen als auch von 3D-Knochenimplantaten, bei deren Herstellung invasive Analysemethoden, soweit als irgend möglich, durch nicht-invasive Medienanalytik ersetzt werden müssen, bestens geeignet. In der Tabelle 3.10 sind die getesteten invasiven Analysemethoden und eventuelle nicht-invasive Alternativen aufgelistet.

**Tabelle 3.9**

#### Getestete nicht-invasive analytische Methoden

Nr.	Nicht-invasive analytische Methoden
<b>Methoden zur Bestimmung von Zellproliferation, Zellvitalität und Zelltod</b>	
1.	Quantitative Bestimmung von D-Glucose und L-Lactat im Kulturüberstand
2.	Quantitative Bestimmung der LDH-Aktivität im Kulturüberstand
3.	Apoptose-Bestimmung im Kulturüberstand (Bestimmung der Aktivität der Caspasen 3 und 7 im Kulturüberstand)
<b>Methoden zur Bestimmung der Zelldifferenzierung</b>	
4.	Bestimmung der ALP-Aktivität im Kulturüberstand
5.	Bestimmung der Kollagen I-Bildung (Quantitative Bestimmung von CICP im Kulturüberstand)
6.	Quantitative Bestimmung von TGF- $\beta$ 1 im Kulturüberstand
<b>Methoden zur Bestimmung der Matrix-Mineralisierung</b>	
7.	Quantitative Bestimmung der Ca <sup>2+</sup> -Konzentration im Kulturüberstand mit dem Calcium-Kit
8.	Quantitative Bestimmung von Osteocalcin im Kulturüberstand

**Tabelle 3.10****Getestete invasive analytische Methoden und eventuelle nicht-invasive Alternativen**

Nr.	Invasive analytische Methoden	Alternative nicht-invasive analytische Methoden
Methoden zur Bestimmung von Zellproliferation, Zellvitalität und Zelltod		
1.	Quantitative Bestimmung des Gesamtproteins	Quantitative Bestimmung von D-Glucose und L-Lactat im Kulturüberstand
2.	Quantitative Bestimmung der Gesamt-DNA (indirekte Zellzahlermittlung)	
3.	Bestimmung der Zellvitalität mit dem WST-1-Reagenz	
4.	Apoptose-Bestimmung in der adhärennten Zellschicht (Bestimmung der Aktivität der Caspasen 3 und 7)	Apoptose-Bestimmung im Kulturüberstand (Bestimmung der Aktivität der Caspasen 3 und 7 im Kulturüberstand) Bestimmung der LDH-Aktivität im Kulturüberstand
Methoden zur Bestimmung der Zelldifferenzierung		
5.	Bestimmung der Aktivität membrangebundener ALP	Bestimmung der ALP-Aktivität im Kulturüberstand
6.	ALP-Färbung	
Methoden zur Bestimmung der Matrix- Mineralisierung		
7.	Quantitative Bestimmung der Ca <sup>2+</sup> -Einlagerung in der extrazellulären Matrix mit dem Calcium-Kit	Quantitative Bestimmung der Ca <sup>2+</sup> -Konzentration im Kulturüberstand mit dem Calcium-Kit; Quantitative Bestimmung von Osteocalcin im Kulturüberstand
8.	Quantitative Bestimmung der Ca <sup>2+</sup> -Einlagerung in der extrazellulären Matrix mit dem Calcein-Test	
9.	Von-Kossa-Färbung	

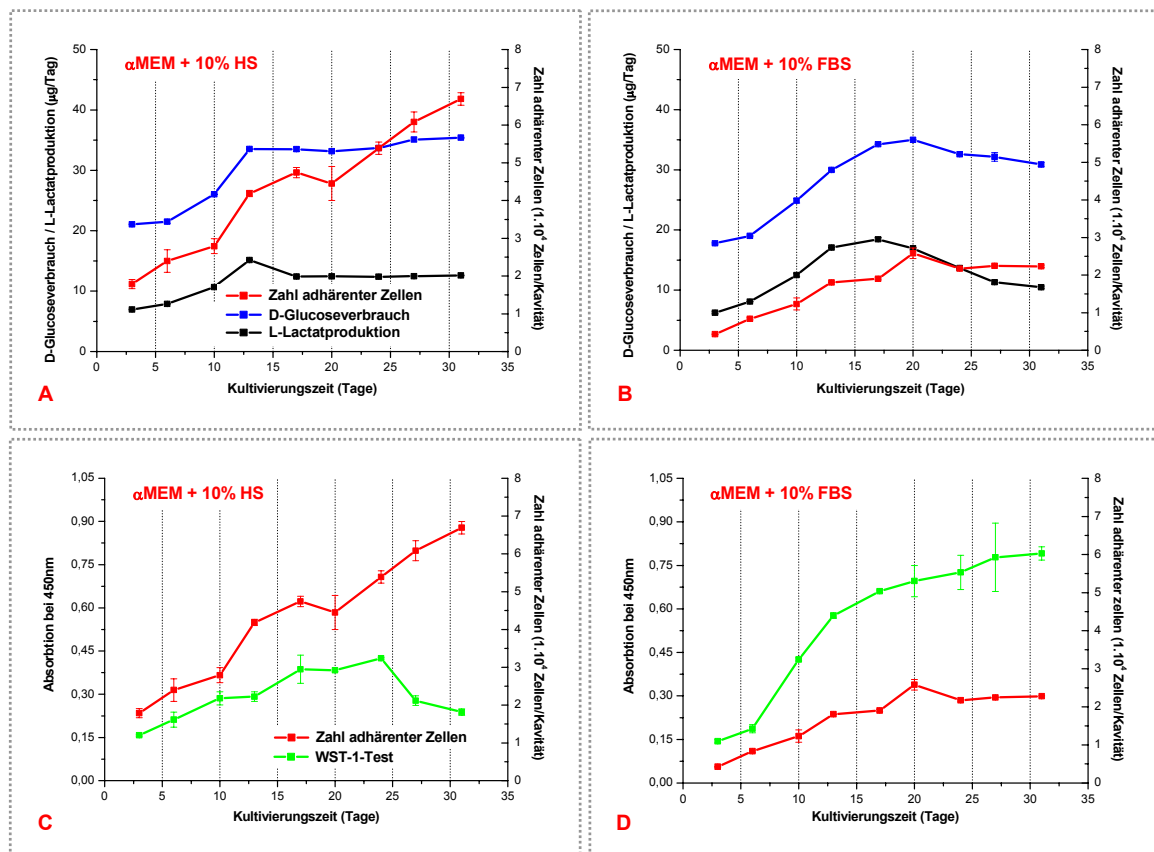
Eine spezielle invasive Methode stellt die Microarray-Analyse der differenziellen Genexpression dar. Die Informativität des entwickelten knochenspezifischen Microarrays und die Perspektiven seines Einsatzes im Kontext des Knochen-Tissue-Engineerings werden näher im Kapitel 3.6.4 betrachtet.

### 3.6.2 Prüfung der Informativität der getesteten Analysetechniken und der Korrelationen zwischen einzelnen invasiven und nicht-invasiven analytischen Methoden

Um die Informativität der getesteten Analysetechniken zu bewerten und eine Auswahl an zuverlässigen nicht-invasiven Methoden zu erhalten, war es wichtig die Korrelationen sowohl zwischen den einzelnen Methoden der gleichen Gruppe als auch zwischen invasiven und nicht-invasiven Analysetechniken zu finden und zu überprüfen. Nur so war es möglich festzustellen, ob und wie zuverlässig invasive Methoden bei der Herstellung humaner Knochenimplantate durch nicht-invasive Methoden ersetzt werden können.

In der Abbildung 3.31 sind zwei repräsentative Beispiele dargestellt, die die Veränderungen in der Zellzahl, in dem Glucoseverbrauch, in der Lactatproduktion und in der Aktivität mitochondriellen Dehydrogenasen (WST-1-Test) während einer Langzeitkultivierung humaner, aus einer heterotopen Ossifikation isolierter osteogener Zellen demonstrieren. Wie eindeutig zu sehen ist, kann die nicht-invasive Ermittlung des D-Glucoseverbrauchs und der L-Lactatproduktion bei einer Langzeitkultivierung humaner Knochenvorläuferzellen nur sehr begrenzt zur Charakterisierung des Zellwachstums eingesetzt werden. Die Werte

dieser biochemischen Parameter werden, wie die durchgeführten Experimente zeigten, offensichtlich von mehreren sich überlagernden Ereignissen beeinflusst. In der Anfangsphase des Experiments, in der der Anteil von metabolisch weniger aktiven Progenitorzellen noch groß ist, der an reifen, metabolisch sehr aktiven Osteoblasten dagegen gering, spiegeln Glucoseverbrauch und Lactatproduktion sowohl die Zunahme der gesamten Zellzahl als auch die Erhöhung des Anteils metabolisch aktiver Zellen wider. Sobald in der Zellkultur als Folge einer fortschreitenden osteogenen Differenzierung ein gewisses Quantum von wenig aktiven Osteozyten erreicht ist, werden die Werte der erwähnten Parameter offenbar nicht nur von der Gesamtzellzahl sondern in hohem Maße auch von der Zusammensetzung der Zellkultur, d.h. vom Verhältnis zwischen metabolisch aktiven und nicht so aktiven Knochenzellen bestimmt. Im Experiment, das in der Abbildung 3.31A dargestellt ist, gingen z.B. der gesamte Verbrauch von D-Glucose und die Produktion von L-Lactat ab ca. dem 13. Kultivierungstag in eine Plateauphase über, obwohl die ermittelte Zahl adhärenter Zellen noch bis zum Ende des Experiments zunahm.

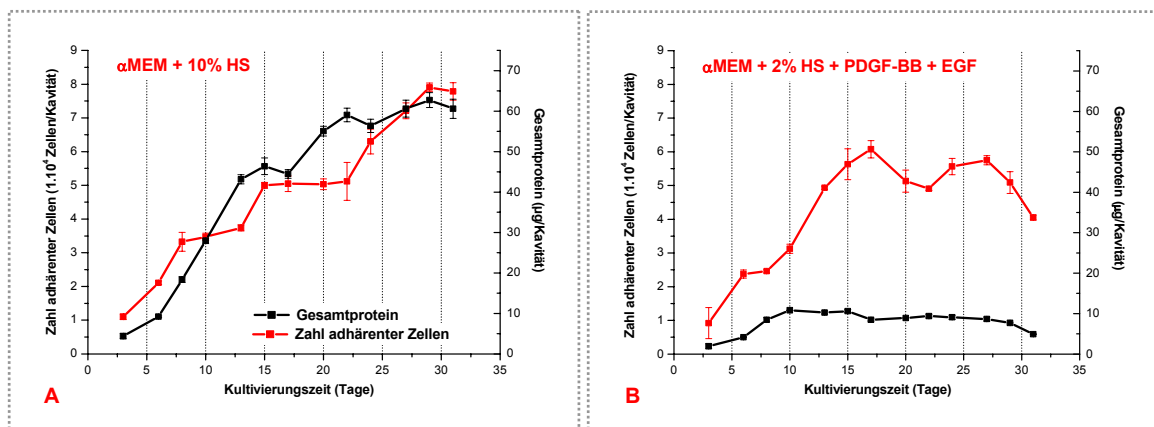


**Abb. 3.31**

Veränderungen der Zahl adhärenter Zellen (indirekte Zellzahlbestimmung), des D-Glucoseverbrauchs, der L-Lactatproduktion und Ergebnisse des WST-1-Tests während einer Langzeitkultivierung humaner osteogener, aus einer heterotopen Ossifikation isolierter Zellen in einem mit osteogenen Supplementen und 10 % HS (A, C) oder einem mit osteogenen Supplementen und 10 % FBS (B, D) angereicherten αMEM. Die Zellen wurden in 48-Loch-Platten kultiviert.

Ferner können der Glucoseverbrauch, die Lactatproduktion und die Ergebnisse des WST-1-Tests, wie die Abbildung 3.31B zeigt, von den Kultivierungsbedingungen bzw. von

der Mediensupplementierung stark beeinflusst werden. Bei der Kultivierung humaner osteogener Zellen in einem mit 10 % FBS angereicherten  $\alpha$ MEM waren der Glucoseverbrauch und die Lactatproduktion mit den Werten, die während der Kultivierung in einem mit 10 % HS angereicherten  $\alpha$ MEM registriert wurden, vergleichbar. Die erfasste Zahl adhärenter Zellen und die Ergebnisse des WST-1-Tests bzw. die Aktivität mitochondrieller Dehydrogenasen wiesen dennoch erhebliche Unterschiede auf (Abb. 3.31C, 3.31D). Die genauen Ursachen der erhöhten metabolischen Aktivität humaner osteogener Zellen bei der Kultivierung in einem mit FBS supplementierten Medium konnten in vorliegender Arbeit nicht genau aufgeklärt werden. Das dargestellte Beispiel beweist allerdings, dass die Ermittlung des Glucoseverbrauchs, der Lactatproduktion und der WST-1-Test, der eigentlich nur die Aktivität mitochondrieller Dehydrogenasen widerspiegelt, unter Umständen völlig falsche Informationen über die proliferative Aktivität knochenbildender Zellen liefern können.

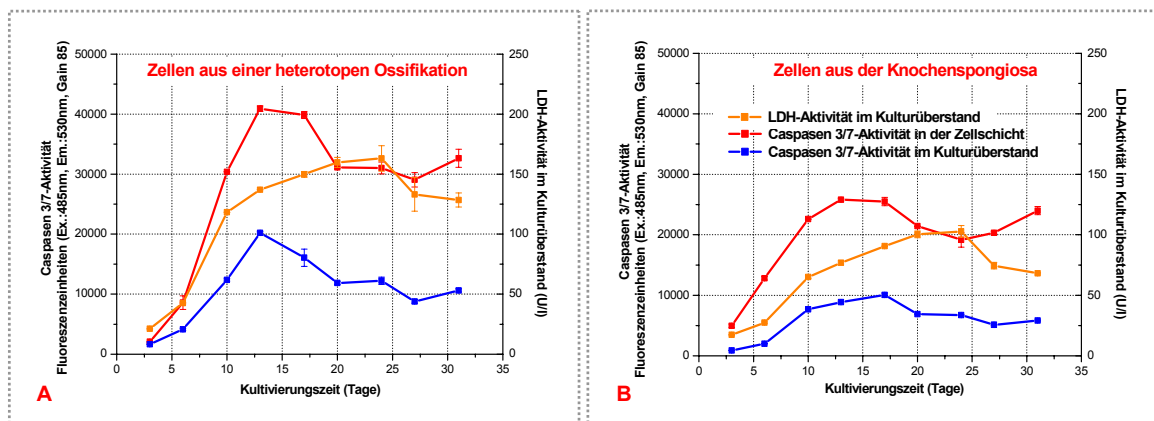


**Abb. 3.32**

Veränderungen der Zahl adhärenter Zellen (indirekte Zellzahlbestimmung) und des Gesamtproteins während einer Kultivierung humaner osteogener, aus einer heterotopen Ossifikation isolierter Zellen in mit osteogenen Supplementen und 10 % HS angereicherten  $\alpha$ MEM (A) oder in mit osteogenen Supplementen und 2 % HS, ITA, 5 ng/ml PDGF-BB und 5 ng/ml EGF angereicherten  $\alpha$ MEM (B). Die Zellen wurden in 48-Loch-Platten kultiviert.

Ähnliches betrifft auch den Zusammenhang zwischen Zellzahl und Gesamtprotein. Nicht selten wird angenommen, dass in einer Zellkultur die Veränderungen im Gehalt des Gesamtproteins die Veränderungen in der Zellzahl widerspiegeln. Abbildung 3.32 belegt jedoch, dass diese Annahme nur unter bestimmten Voraussetzungen erfüllt wird. Da in der Knochenmatrix substanzielle Mengen an Serumproteinen akkumuliert werden (siehe auch 3.4.2), ist dieser Vorgang bei der Kultivierung osteogener Zellen in einem mit 10 % HS supplementierten Medium viel stärker ausgeprägt als bei der Kultivierung unter serumreduzierten Bedingungen. Eine separate Ermittlung des Proteingehalts hätte z.B. in dem konkreten Fall, in dem die beiden Kultivierungsverfahren miteinander verglichen wurden, eine völlig falsche Aussage über die Unterschiede in der proliferativen Aktivität der knochenbildenden Zellen geliefert. Der Vergleich des Zellwachstums mittels

Gesamtproteinbestimmung ist daher nur zwischen Experimenten, die unter ähnlichen Kultivierungsbedingungen durchgeführt werden, zulässig.



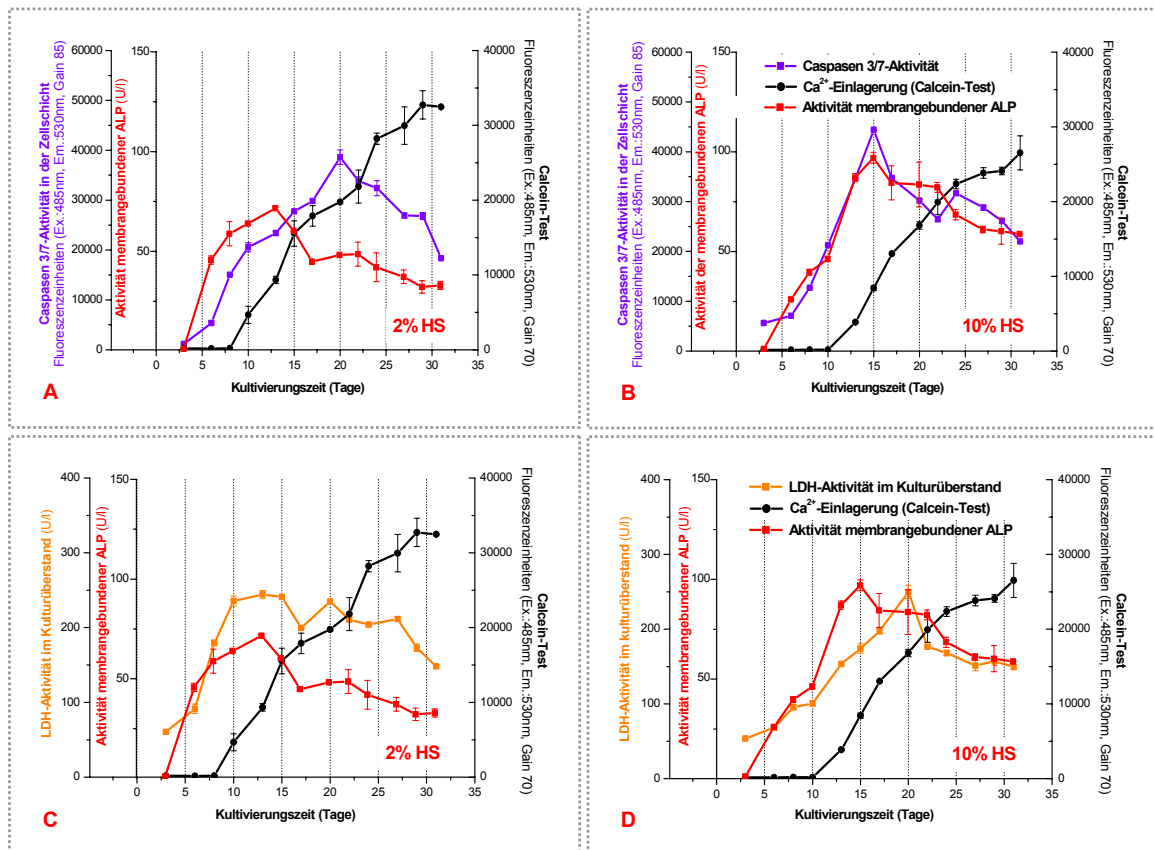
**Abb. 3.33**

**Zusammenhang zwischen der LDH-Aktivität im Kulturüberstand und der Aktivität der Caspasen 3 und 7 in der adhärenen Zellschicht und im Kulturüberstand.** Humane osteogene, aus einer heterotopen Ossifikation (A) oder Knochenspongiosa (B) isolierte Zellen wurden in 48-Loch-Platten in mit osteogenen Supplementen und 10 % HS angereichertem  $\alpha$ MEM kultiviert.

Die Intensität der Apoptose und der Nekrose bzw. der sekundären Nekrose während der Langzeitkultivierung osteogener Zellen wurde über die Aktivität der Caspasen 3 und 7 und die LDH-Aktivität im Kulturüberstand ermittelt. Die Abbildungen 3.33A und 3.33B stellen die Ergebnisse zweier Experimente dar, die den Zusammenhang zwischen der Aktivität der Caspasen 3 und 7 in der adhärenen Zellschicht und im Kulturüberstand aufzeigen. Wie zu sehen ist, spiegeln die im Kulturüberstand bestimmten Aktivitätswerte ziemlich präzise die Veränderungen der Aktivität der Caspasen 3 und 7 in der adhärenen Zellschicht wider. Demnach kann die invasive Apoptose-Bestimmung mit ausreichender Zuverlässigkeit auch durch ihre nicht-invasive Alternative ersetzt werden.

Ein rapider Anstieg der Aktivität der Caspasen 3 und 7 ist bei einer postkonfluenten Langzeitkultivierung, wie die Abbildungen 3.34A und 3.34B zeigen, schon in der Phase der Matrix-Bildung und Reifung zu beobachten. In diesem Zeitraum ist die Intensivierung apoptotischer Prozesse bei einer Kultivierung unter optimalen Bedingungen, d.h. in einem mit 10 % HS angereicherten Medium (Abb. 3.34B), hauptsächlich mit einer schnell voranschreitenden Ausbildung der ECM, mit dem Anstieg der ALP-Aktivität und dem nachfolgenden Beginn der Mineraleinlagerung verbunden (siehe 3.1.1 und 3.1.2.2). In der Phase einer zunehmenden Matrix-Mineralisierung, die durch eine Reduzierung sowohl der Kollagen I- als auch der ALP-Expression gekennzeichnet ist, wird auch ein Abfall der Aktivität der Caspasen 3 und 7 registriert. Da in den In-vitro-Zellkulturen auch die Lysis von apoptotischen Körpern (sekundäre Nekrose), welche im Endstadium der Apoptose zu beobachten ist, zum Anstieg der LDH-Aktivität im Kulturüberstand führt, kann die Ermittlung der LDH-Aktivität mit Hilfe des Cytotoxicity detection Kits (Roche) die vergleichsweise teurere Apoptose-Bestimmung mit dem Apo-One™ Assay (Promega) ersetzen und

ähnliche Informationen über die Vitalität der Zellen und den Verlauf der In-vitro-Knochenbildung liefern (siehe Abb. 3.4 und 3.34D). Die maximale LDH-Aktivität im Kulturüberstand, d.h. die höchste Intensität der sekundären Nekrose wird bei der Kultivierung in einem mit 10 % HS angereicherten Medium allerdings etwas später als die Höchstwerte der Aktivität der Caspasen 3 und 7 erreicht (Abb. 3.33, 3.34B, 3.34D).



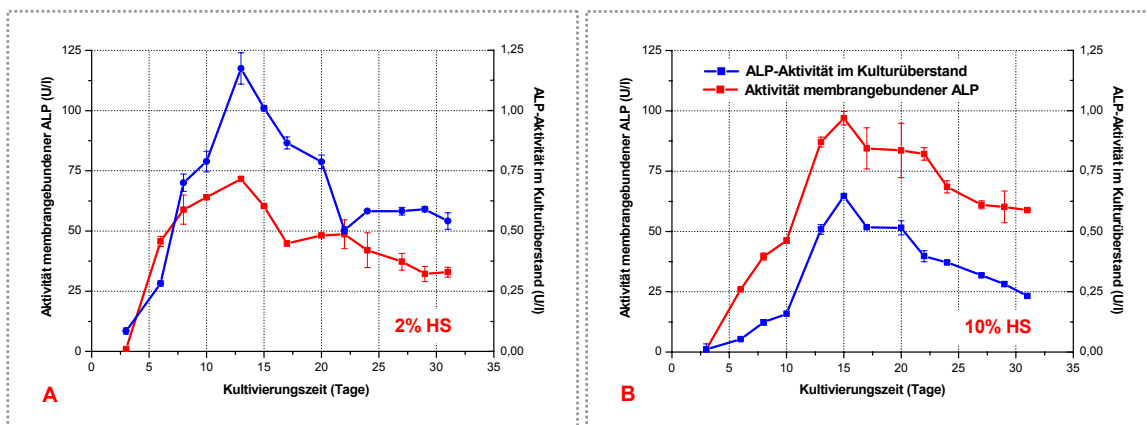
**Abb. 3.34**

**Zusammenhang zwischen den Veränderungen in der Aktivität der Caspasen 3 und 7 in der adhären Zellschicht, der LDH-Aktivität im Kulturüberstand, der Aktivität membrangebundener ALP und der Ca<sup>2+</sup>-Einlagerung in der ECM (Calcein-Test). Humane osteogene, aus einer heterotopen Ossifikation isolierte Zellen wurden in 48-Loch-Platten in mit 2 % HS, ITA, 5 ng/ml PDGF-BB, 5 ng/ml EGF und osteogenen Supplementen angereichertem  $\alpha$ MEM (A, C) oder in mit 10 % HS und osteogenen Supplementen angereichertem  $\alpha$ MEM (B, D) kultiviert.**

Beim serumreduzierten Kultivierungsverfahren ist jedoch zu beachten, dass das Absterben knochenbildender Zellen nicht nur mit der fortschreitenden Osteogenese verbunden ist sondern auch durch die Reduzierung des Serumgehalts und die Zugabe von Wachstumsfaktoren beeinflusst wird (siehe 3.4.1 und 3.4.2). Am Anfang des Experiments bewirkt z.B. die Zugabe von Wachstumsfaktoren eine sehr starke Proliferation der Knochenvorläuferzellen. Ein Teil von ihnen kann wahrscheinlich nicht sofort in die adhären Zellschicht eingebaut werden und gelangt daher in den Kulturüberstand. Das Ausbleiben von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten leitet in dieser Fraktion der Zellen apoptotische Prozesse ein (siehe Abb. 3.19). So erklärt sich auch der viel schnellere Anstieg der LDH-Aktivität bzw. die viel höhere Intensität der sekundären Nekrose schon in



der Anfangsphase des Experiments (Abb. 3.34C). Obwohl in der zweiten Hälfte des Experiments die Kollagen I-Synthese und die ALP-Aktivität in den unter serumreduzierten Bedingungen geführten Zellkulturen in der Regel eindeutig geringer sind, wird auch hier eine vergleichsweise hohe Intensität apoptotischer und nekrotischer Prozesse beobachtet (Abb. 3.23, 3.34A, 3.34C). Diese Erscheinung ist wahrscheinlich mit einem vermehrten Absterben gerade reifer Osteoblasten unter der andauernden Einwirkung von Wachstumsfaktoren zu erklären.

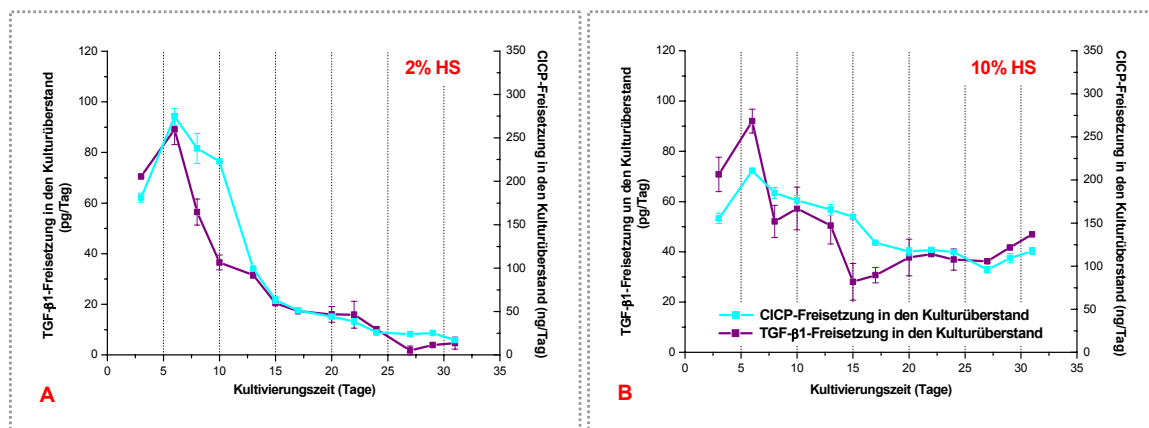


**Abb. 3.35**

Der Zusammenhang zwischen der Aktivität membrangebundener ALP und der ALP-Aktivität im Kulturüberstand. Humane osteogene, aus einer heterotopen Ossifikation isolierte Zellen wurden in 48-Loch-Platten in mit 2 % HS, ITA, 5 ng/ml PDGF-BB, 5 ng/ml EGF und osteogenen Supplementen angereichertem  $\alpha$ MEM (A) oder in mit 10 % HS und osteogenen Supplementen angereichertem  $\alpha$ MEM (B) kultiviert.

Die Analyse des Zusammenhangs zwischen der Aktivität membrangebundener und im Kulturüberstand gelöster ALP zeigte, dass die invasive Ermittlung der Aktivität membrangebundener ALP prinzipiell auch durch ihre nicht-invasive Alternative, d.h. die Bestimmung der ALP-Aktivität im Kulturüberstand, ersetzt werden kann (Abb. 3.35). Bei der Kultivierung humaner osteogener Zellen in einem mit 10 % HS angereicherten Medium ist die Korrelation zwischen der beiden Analysemethoden allerdings eindeutiger, d.h. die Veränderungen der Aktivität membrangebundener ALP werden viel präziser durch die im Kulturüberstand gemessenen Werte wiedergegeben als bei einer serumreduzierten Kultivierung (siehe auch Abb. 3.3). Im ersten Fall wird die im Kulturüberstand präsente ALP offensichtlich großteils von der Zellmembran intakter, in der adhären Zellschicht integrierter Zellen freigesetzt (siehe 1.2.2.2). Bei einer serumreduzierten Kultivierung wird die ALP-Aktivität im Kulturüberstand in einem deutlich höheren Maße auch von apoptotischen Prozessen beeinflusst. Daher ist, wie Abbildung 3.35 eindeutig belegt, bei einer nicht-invasiven Ermittlung der ALP-Aktivität eine Aussage über den Expressionsgrad dieses osteogenen Markers nur dann möglich, wenn die zu vergleichenden Experimente unter ähnlichen Kultivierungsbedingungen durchgeführt werden. Zur präzisen Interpretation der gewonnenen Daten ist offenbar auch eine gleichzeitige Bestimmung der LDH-Aktivität im Kulturüberstand erforderlich.

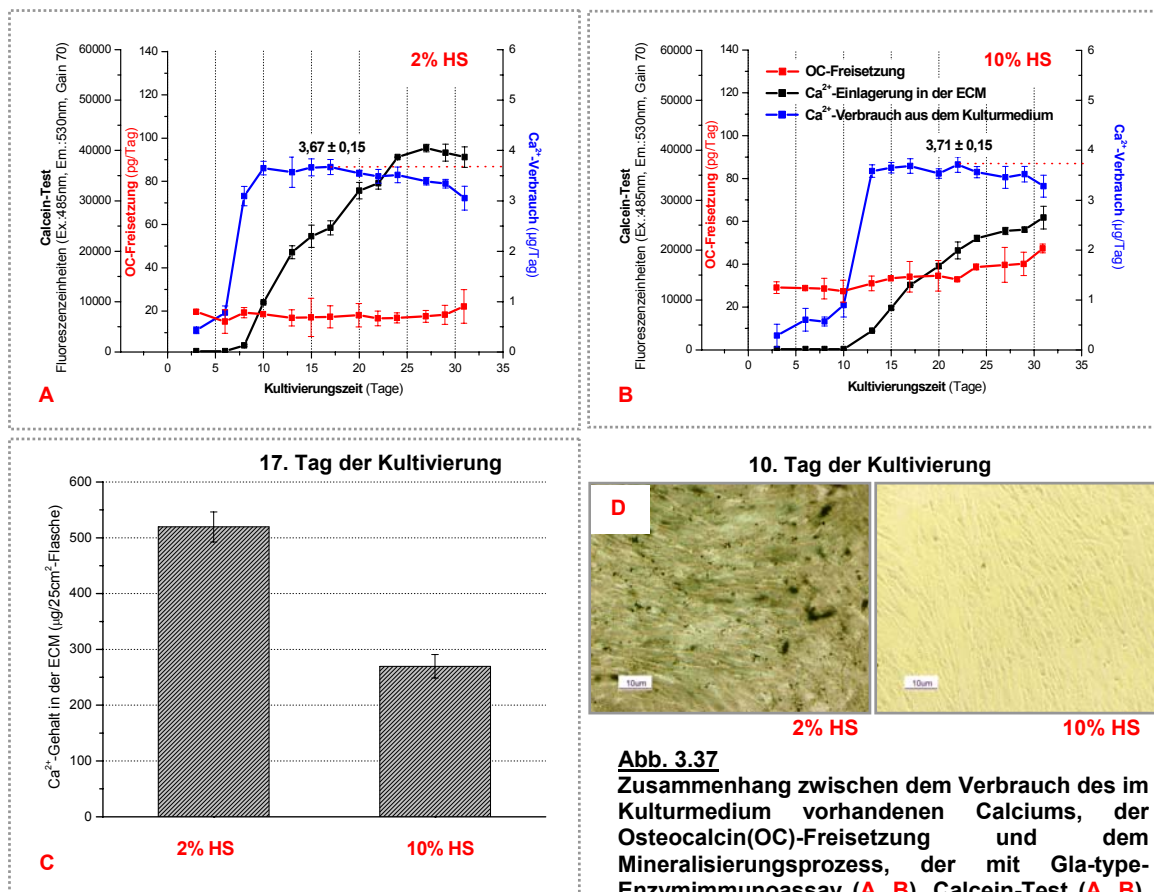


**Abb. 3.36**

Der Zusammenhang zwischen der CICP- und TGF-β1-Freisetzung in den Kulturüberstand. Humane osteogene, aus einer heterotopen Ossifikation isolierte Zellen wurden in 48-Loch-Platten in mit 2 % HS, ITA, 10 ng/ml PDGF-BB, 10 ng/ml EGF und osteogenen Supplementen angereichertem αMEM (A) oder in mit 10 % HS und osteogenen Supplementen angereichertem αMEM (B) kultiviert.

Die parallele Ermittlung der Veränderungen der CICP-Freisetzung und der Konzentration von TGF-β1 im Kulturüberstand im Laufe der Langzeitkultivierung humaner osteogener Zellen zeigte, dass die aufgezeichneten Kurven sehr ähnlich verlaufen (Abb. 3.36). Im Kulturüberstand der beiden experimentellen Ansätze wurden die höchsten Konzentrationen des latenten, nicht in der Knochenmatrix eingebauten TGF-β1 während der Phase einer intensiven Kollagen I-Matrix-Bildung registriert, was zweifellos auf die Beteiligung dieses Wachstumsfaktors an dem erwähnten Prozess hindeutet (siehe auch 1.2.2.4). Da humanes Serum und damit das verwendete mit 10 % HS angereicherte Kulturmedium substantielle Mengen an latentem TGF-β1 enthielt (so entsprach die Konzentration von TGF-β1 in dem mit 10 % HS angereicherten αMEM  $3,29 \pm 0,11$  ng/ml), mussten die Proben vor der Durchführung des Analyseverfahrens 8fach verdünnt und die ermittelten TGF-β1-Konzentrationen gegen die TGF-β1-Konzentration im Medium verrechnet werden. Daher ermöglichte die serumreduzierten Kultivierung eine deutlich präzisere Bestimmung dieses biochemischen Parameters. Die Bestimmung der TGF-β1-Konzentration im Kulturüberstand lieferte allerdings keine zusätzlichen Informationen, die für ein nicht-invasives Monitoring der In-vitro-Osteogenese unentbehrlich wären.

Auf der Suche nach alternativen, nicht-invasiven Methoden zur Bestimmung der Matrix-Mineralisierung wurden der Verbrauch des im Kulturmedium vorhandenen Calciums und die Konzentration von Osteocalcin im Kulturüberstand bestimmt. Um die Informativität dieser nicht-invasiven Analysemethoden zu überprüfen, wurden die gewonnenen Daten mit den Ergebnissen des parallel durchgeführten Calcein-Tests verglichen. In den Abbildungen 3.36A und 3.36B sind zwei typische Beispiele dargestellt, die die Veränderungen dieser Parameter während einer Langzeitkultivierung widerspiegeln. Für die Kultivierung humaner osteogener Zellen wurde sowohl ein serumreduziertes als auch ein mit 10 % HS angereichertes Medium verwendet.



**Abb. 3.37** Zusammenhang zwischen dem Verbrauch des im Kulturmedium vorhandenen Calciums, der Osteocalcin(OC)-Freisetzung und dem Mineralisierungsprozess, der mit Gla-type-Enzymimmunoassay (A, B), Calcein-Test (A, B), Calcium-Kit (A, B, C) und mit der Von-Kossa-Färbung (D) ermittelt wurde. Humane osteogene, aus einer heterotopen Ossifikation isolierte Zellen wurden entweder in 48-Loch-Platten (A, B, D) oder T25-Flaschen (C) in mit 2% HS, ITA, 10 ng/ml PDGF-BB, 10 ng/ml EGF und osteogenen Supplementen angereichertem  $\alpha$ MEM oder in mit 10% HS und osteogenen Supplementen angereichertem  $\alpha$ MEM kultiviert.

Wie aus den Abbildungen 3.37A und 3.37B ersichtlich, konnten in den Kulturüberständen beider Zellkulturen keine signifikanten Veränderungen der Osteocalcin-Konzentration registriert werden. Die dargestellten Daten wurden mit dem Gla-type-Enzymimmunoassay (TaKaRa) gewonnen. Auch die drei anderen parallel geprüften Testsysteme, Glu-OC-Enzymimmunoassay (TaKaRa, Tokyo, Japan), NovoCalcin®-Enzymimmunoassay (Quidel Deutschland, Heidelberg) und N-MID™ Osteocalcin One Step ELISA (Osteometer BioTech, Herlev, Dänemark), die ebenfalls für klinische Anwendungen entwickelt wurden und vorwiegend für die Bestimmung humanen Osteocalcins im Serum vorgesehen sind, ergaben kein anderes Messergebnis. Offensichtlich wird in einer In-vitro-Kultur der absolute Großteil des von humanen Osteoblasten neu synthetisierten Osteocalcins in die ECM eingebaut. Die Menge an Osteocalcin, die nach seiner Synthese und Sekretion in den Kulturüberstand gelangt, ist wahrscheinlich so gering, dass sie an der unteren Nachweisgrenze der getesteten Assays liegt. Diese Behauptung unterstützte auch die Microarray-Analyse der differentiellen Genexpression (siehe 3.4.3). In beiden experimentellen Ansätzen wurde für das Osteocalcin-Gen ein deutliches Fluoreszenzsignal registriert, d.h. dieses Gen wurde transkribiert und mit einer sehr großen

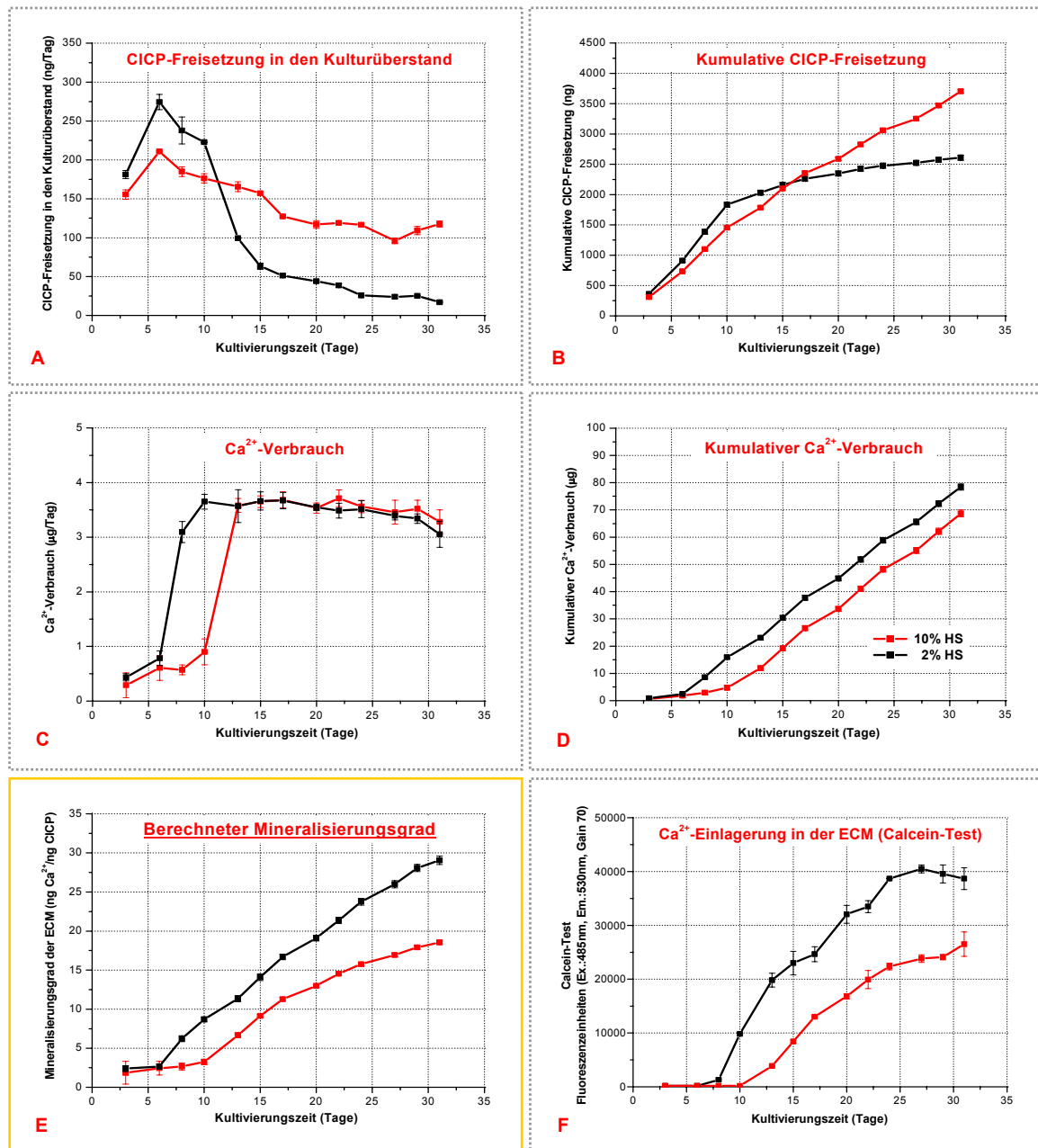
Wahrscheinlichkeit auch als Protein exprimiert. In Kulturen humaner osteogener Zellen ist ein nicht-invasiver Nachweis dieses hochspezifischen Markers der osteogenen Differenzierung offensichtlich nur sehr schwer möglich. Demzufolge ist die Ermittlung von Osteocalcin im Kulturüberstand humaner Zellkulturen keine zuverlässige Alternative zu den konventionellen invasiven Analysemethoden der Mineraleinlagerung.

Da der Osteocalcin-Gehalt im Knochengewebe von Spezies zu Spezies sehr stark variiert und die Knochen z.B. einer Ratte fast 10-mal mehr dieses nichtkollagenösen, das Wachstum der Hydroxylapatit-Kristallen regulierenden Proteins enthalten als humanes Gewebe [Sodek et al., 2001], ist es in Kulturen osteogener Rattenzellen gut nachweisbar [Barthold, 2003]. In diesen Zellkulturen könnte deshalb auch die Bestimmung der Osteocalcin-Konzentration im Kulturüberstand eine Methoden der Wahl darstellen.

Viel bessere Möglichkeiten einer nicht-invasiven Detektion der Mineralisierung bietet in Kulturen humaner osteogener Zellen die Bestimmung des Verbrauchs an im Kulturmedium vorhandenem Calcium. In den durchgeführten Experimenten wurde mit dem Beginn der Mineraleinlagerung, der mit dem Calcein-Test ermittelt wurde, eine schlagartige Zunahme des  $\text{Ca}^{2+}$ -Verbrauchs beobachtet, wie die Abbildungen 3.37A und 3.37B überzeugend demonstrieren. Innerhalb kürzester Zeit, d.h. nach 3 bis 4 Tagen, erreichten die Werte eine Plateauphase. Erst zum Ende des Experiments hin, d.h. mit einer spürbaren Reduzierung der Intensität der Mineraleinlagerung, war eine Tendenz zu einem geringeren  $\text{Ca}^{2+}$ -Verbrauch zu registrieren.

Der Verlauf der aufgezeichneten Kurven bestätigt erneut, dass bei einer In-vitro-Kultivierung humaner osteogener Zellen der Mineralisierungsgrad der ECM in einem hohen Maße vom Calcium-Gehalt im Kulturmedium beeinflusst bzw. limitiert wird. Im konkreten Fall entsprach z.B. die berechnete theoretische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in mit 10 % HS angereichertem  $\alpha$ MEM 71,65 mg/l (siehe Tab. 3.1) und in mit 2 % HS angereichertem  $\alpha$ MEM 70,65 mg/l. Da den osteogenen Zellen bei der Kultivierung in 48-Loch-Platten und einem dreimal in der Woche vorgenommenen Medienwechsel innerhalb von 48 h 100  $\mu$ l von  $\alpha$ MEM zur Verfügung standen, ist leicht zu berechnen, dass in diesem Volumen 7,165  $\mu$ g oder 7,065  $\mu$ g Calciums gelöst waren. Bereits ab dem 10.-13. Kultivierungstag entspricht der registrierte tägliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Verbrauch ziemlich präzise den theoretisch möglichen Werten (3,58  $\mu$ g bzw. 3,53  $\mu$ g).

Die nicht-invasive Bestimmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Verbrauchs ermöglicht eine sehr präzise Ermittlung des Zeitpunkts, an dem die Mineraleinlagerung initiiert wird (siehe auch Abb. 3.40). Diese Annahme bestätigte nicht nur der Calcein-Test sondern auch die am 10. Tag des Experiments durchgeführte Von-Kossa-Färbung (Abb. 3.36D). Mit dieser histologischen Färbetechnik war zu diesem Zeitpunkt nur in Zellkulturen, die unter serumreduzierten Bedingungen geführt wurden, eine erkennbare  $\text{Ca}^{2+}$ -Einlagerung nachzuweisen.

**Abb. 3.38**

Nicht-invasive Ermittlung des erreichten Mineralisierungsgrads der ECM und Vergleich der gewonnenen Daten mit den Ergebnissen des Calcein-Test. **A** - Kinetik der CACP-Freisetzung in den Kulturüberstand; **B** - kumulative CACP-Freisetzung, die direkt proportional zum Umfang der angelagerten Kollagen I-Matrix ist; **C** - Kinetik des  $\text{Ca}^{2+}$ -Verbrauchs; **D** - kumulativer  $\text{Ca}^{2+}$ -Verbrauch; **E** - berechneter Mineralisierungsgrad der ECM, der über den kumulativen  $\text{Ca}^{2+}$ -Verbrauch und die kumulative CACP-Freisetzung ermittelt wurde; **F** - Ergebnisse der invasiven Bestimmung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Einlagerung in der ECM mit dem Calcein-Test.

Humane osteogene, aus einer heterotopen Ossifikation isolierte Zellen wurden in 48-Loch-Platten in mit 2 % HS, ITA, 10 ng/ml PDGF-BB, 10 ng/ml EGF und osteogenen Supplementen angereichertem  $\alpha$ MEM oder in mit 10 % HS und osteogenen Supplementen angereichertem  $\alpha$ MEM kultiviert.

Nachdem die maximalen Werte des  $\text{Ca}^{2+}$ -Verbrauchs erreicht sind, im konkreten Fall ab dem 10.-13. Kultivierungstag, gibt diese nicht-invasive Analyseverfahren allerdings keine direkte Information über den schon erreichten Mineralisierungsgrad der ECM mehr. So wies der Gehalt an in der ECM eingelagertem Calcium, der am 17. Kultivierungstag in beiden experimentellen Ansätzen bestimmt wurde (Abb. 3.37C), deutliche Differenzen auf,

obwohl sich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Verbrauch in den untersuchten Zellkulturen zu diesem Zeitpunkt nahezu auf dem gleichen Niveau befand (Abb. 3.37A, 3.37B).

Die nicht-invasive Ermittlung der CICP-Freisetzung (Abb. 3.38A) und des  $\text{Ca}^{2+}$ -Verbrauchs (Abb. 3.38C) erlauben aber die Berechnung von zwei weiteren Parametern: der insgesamt freigesetzten Menge an CICP, die direkt proportional zum Umfang der gebildeten Kollagen I-Matrix ist (Abb. 3.38B), und des insgesamt verbrauchten Calciums (Abb. 3.38D). Über diese Größen ist eine indirekte Ermittlung, d.h. eine Berechnung, des erreichten Mineralisierungsgrads möglich (Abb. 3.38E). Diese Analysemethode ist wegen der vielen Rechenschritte zwar weniger präzise als eine direkte, invasive Bestimmung der Matrix-Mineralisierung z.B. mit dem Calcein-Test, gibt aber trotzdem eine generelle Vorstellung vom Mineralisierungsgrad unterschiedlicher Zellkulturen und stimmt grundsätzlich auch mit den Ergebnissen des Calcein-Tests und der Von-Kossa-Färbung überein (Abb. 3.38F, 3.37D).

Um eine genaue Interpretation der gewonnenen Daten zu gewährleisten, ist außerdem wichtig zu wissen, dass der Zeitpunkt des Beginns der Mineralisierung („mineralization lag time“), die Mineralisierungsgeschwindigkeit und der Mineralisierungsgrad nicht nur durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt im Medium bestimmt werden. Die Konzentration von nichtkollagenösen Matrixproteinen (Nukleatoren und Inhibitoren der Mineraleinlagerung), die ALP-Aktivität, die Menge der angelegten Kollagen I-Matrix und die Serumkonzentration bzw. die Konzentration von systemischen Inhibitoren der Calcifizierung im verwendeten Medium sind Faktoren, die dabei eine nicht weniger wichtige Rolle spielen (siehe auch 1.1.6 und 3.4.4).

### 3.6.3 Geeignete nicht-invasive analytische Methoden

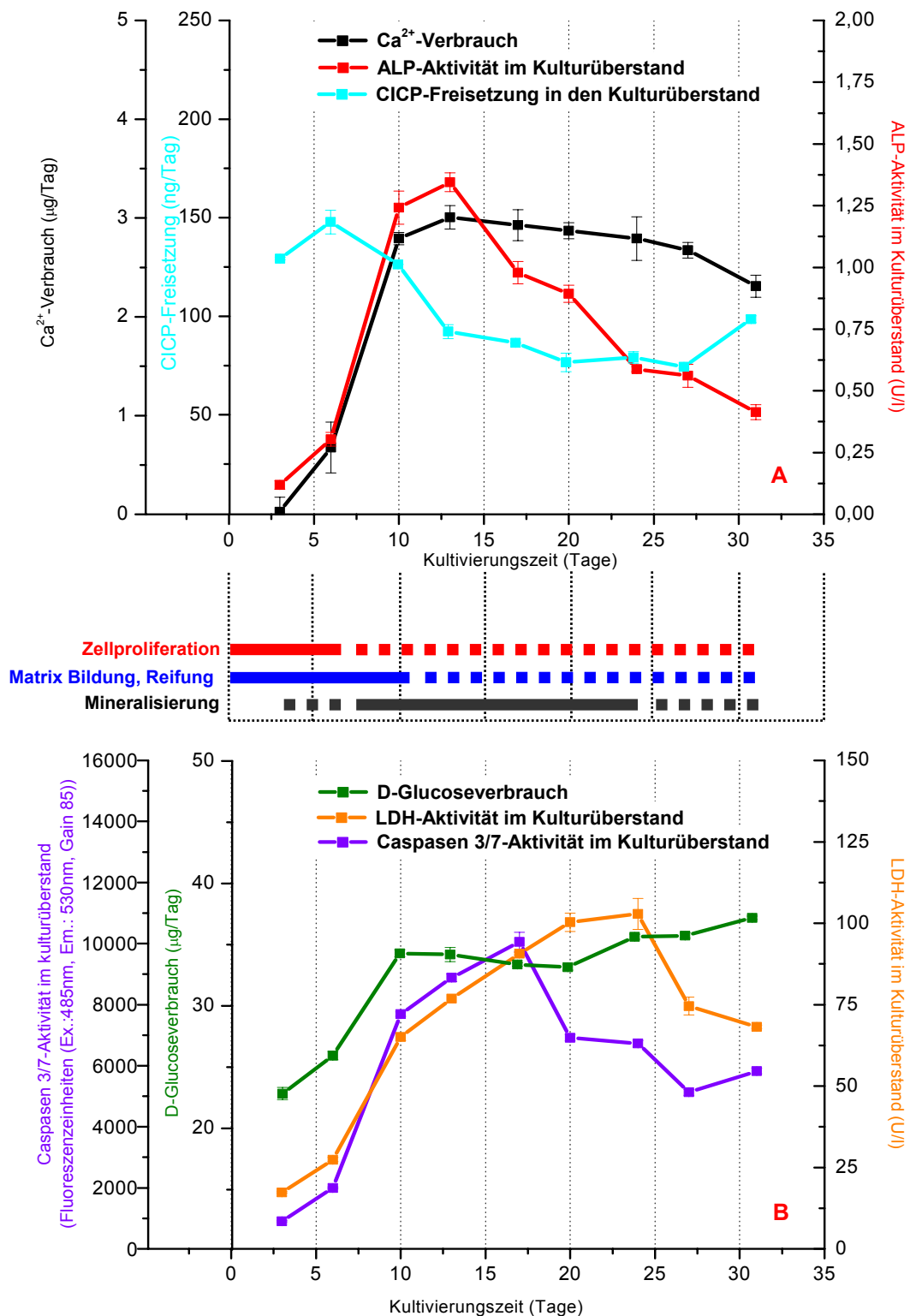
Die Prüfung der Informativität der angewandten Analysetechniken erlaubte es eine Auswahl nicht-invasiver Methoden zusammenzustellen, die für ein umfassendes und zuverlässiges, nicht-invasives Monitoring von 2D- und voraussichtlich auch 3D-Kulturen humaner osteogener Zellen ausreichend ist. Die ausgewählten Methoden zeigen die Differenzierung der Knochenvorläuferzellen, geben direkte Informationen über den Expressionsgrad der wichtigsten osteogenen Marker (Kollagen I, ALP) und ermöglichen damit einen detaillierten Einblick in den Verlauf der In-vitro-Osteogenese. In Tabelle 3.11 sind 6 empfehlenswerte nicht-invasive Methoden und die typischen Veränderungen der zu analysierenden Parameter während einer 2D-Kultivierung humaner primärer knochenbildender Zellen in einem mit 10 % HS und osteogenen Supplementen angereicherten  $\alpha$ MEM aufgelistet. Abbildung 3.39A zeigt am Beispiel der Daten, die aus einem Experiment mit humanen aus der Knochenspongiosa isolierten Zellen der 6. Passage gewonnen wurden, das Schema der drei Phasen einer In-vitro-Osteogenese.

Bei diesem Experiment wurden die biochemischen Untersuchungen und der Medienwechsel zweimal in der Woche vorgenommen.

**Tabelle 3.11**

**Ausgewählte nicht-invasive Analysemethoden zur Charakterisierung der Proliferation und Differenzierung humaner osteogener Zellen**

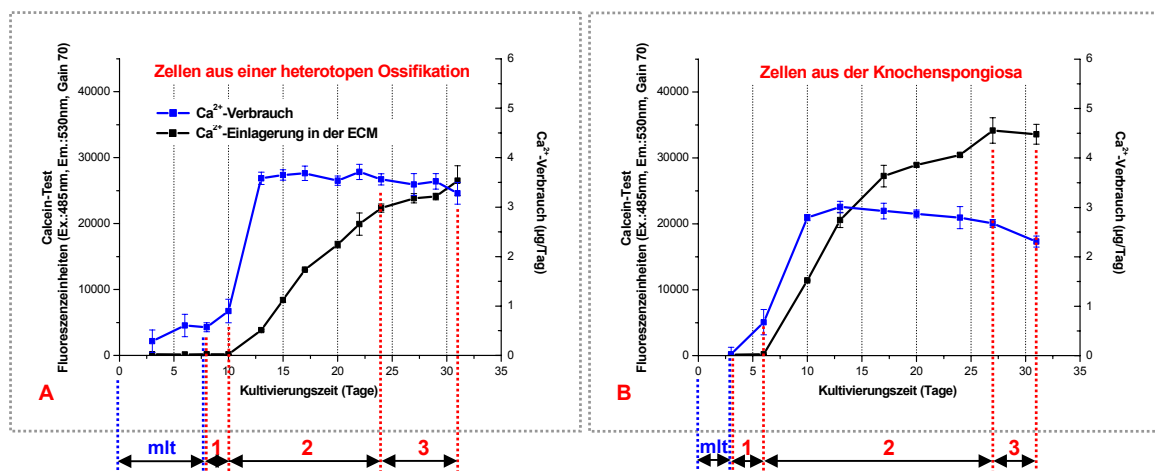
Ausgewählte nicht-invasive Analysemethoden	Phase der Osteogenese	Charakteristische Veränderungen der analysierten Parameter	Typisches Beispiel	
<ul style="list-style-type: none"><li>Bestimmung des Glucoseverbrauchs und der Lactatproduktion</li><li>Bestimmung der Aktivität der Caspasen 3 und 7 im Kulturüberstand</li><li>Bestimmung der LDH-Aktivität im Kulturüberstand</li><li>Bestimmung der CICP-Freisetzung in den Kulturüberstand</li><li>Bestimmung der ALP-Aktivität im Kulturüberstand</li><li>Bestimmung des Ca<sup>2+</sup>-Verbrauchs</li></ul>	<u>Zellproliferation</u>	<ul style="list-style-type: none"><li>Zunahme des D-Glucoseverbrauchs und der L-Lactatproduktion</li><li>Anstieg der Kollagen I-Synthese</li></ul>	Abb. 3.14D  Abb. 3.15A, 3.15B	
	<u>Matrix-Bildung und -Reifung</u>	<ul style="list-style-type: none"><li>Kollagen I-Synthese erreicht das Maximum</li><li>Anstieg der ALP-Aktivität im Kulturüberstand</li><li>Anstieg der Aktivität der Caspasen 3 und 7 im Kulturüberstand</li><li>Anstieg der LDH-Aktivität im Kulturüberstand</li></ul>	Abb. 3.2, 3.10, 3.39A Abb. 3.10, 3.39A  Abb. 3.34B, 3.39B  Abb. 3.34D	
	<u>Matrix-Mineralisierung</u>	<u>Initiierungsphase</u>	<ul style="list-style-type: none"><li>Leichte Zunahme des Ca<sup>2+</sup>-Verbrauchs</li><li>Beginnende Verringerung der Kollagen I-Synthese</li></ul>	Abb. 3.39A, 3.40  Abb. 3.39A
		<u>Progressionsphase</u>	<ul style="list-style-type: none"><li>Rapide Zunahme des Ca<sup>2+</sup>-Verbrauchs</li><li>Ca<sup>2+</sup>-Verbrauch erreicht Plateauphase</li><li>D-Glucoseverbrauch und L-Lactatproduktion erreichen Plateauphase</li><li>Weitere Verringerung der Kollagen I-Synthese</li><li>ALP-Aktivität im Kulturüberstand erreicht das Maximum</li><li>Aktivität der Caspasen 3 und 7 im Kulturüberstand erreicht das Maximum</li><li>LDH-Aktivität im Kulturüberstand erreicht das Maximum</li></ul>	Abb. 3.39A, 3.40  Abb. 3.39A, 3.40  Abb. 3.14D, 3.39B  Abb. 3.10, 3.39A  Abb. 3.33D, 3.38A  Abb. 3.34B, 3.39B  Abb. 3.34D, 3.39B
		<u>Plateauphase</u>	<ul style="list-style-type: none"><li>Leichte Verringerung des Ca<sup>2+</sup>-Verbrauchs</li><li>Abnahme der ALP-Aktivität im Kulturüberstand</li><li>Abnahme der Aktivität der Caspasen 3 und 7 im Kulturüberstand</li><li>Abnahme der LDH-Aktivität im Kulturüberstand</li></ul>	Abb. 3.39A, 3.40  Abb. 3.39A  Abb. 3.34B, 3.39B  Abb. 3.34D, 3.39B

**Abb. 3.39**

Die drei Phasen der In-vitro-Osteogenese am Beispiel von Daten, die aus einem Langzeitexperiment mit humanen, aus der Knochenspongiosa isolierten Zellen gewonnen wurden. Eine Punktstrich-Linie deutet jeweils auf eine geringere Intensität der entsprechenden Prozesse hin.

**A** - Ca<sup>2+</sup>-Verbrauch, CACP-Freisetzung und ALP-Aktivität im Kulturüberstand; **B** - Glucoseverbrauch, Aktivität der Caspasen 3 und 7 und LDH-Aktivität im Kulturüberstand. Die osteogenen Zellen wurden in mit 10 % HS und osteogenen Supplementen angereichertem  $\alpha$ MEM kultiviert.

Da Kulturen primärer osteogener Zellen nur in ganz seltenen Fällen eine uniforme Zellpopulation darstellen sondern sich meist aus Zellen unterschiedlicher Entwicklungsstadien zusammensetzen, bestehen zwischen den einzelnen Phasen der Knochengewebusbildung, wie auch aus Abbildung 3.39A deutlich ersichtlich, keine festen Grenzen. Bei der In-vitro-Kultivierung humaner osteogener Zellen in einem mit 10 % HS angereicherten Medium ist der Übergang von einer in die andere Phase der Osteogenese besonders fließend, d.h. Ereignisse, die als charakteristische Marker für diese Phasen gelten, überschneiden sich stark. So wird z.B. Zellwachstum nicht nur in der Proliferationsphase der Osteogenese beobachtet, wie Stein et al. [1996] in Experimenten mit osteogenen Rattenzellen belegten (siehe 1.2.1). Unter der Voraussetzung, dass die Kultur humaner osteogener Zellen zum Beginn des Experiments einen ausreichend großen Pool früher, zur Proliferation befähigter Osteoprogenitoren beherbergt, kann auch weit nach dem Erreichen eines konfluenten Zustands, d.h. sogar am Ende des Langzeitexperiments, ein vergleichsweise ergiebiges Zellwachstum beobachtet werden (siehe Abb. 3.32A). Ähnliches betrifft auch die Kollagen I-Matrix-Bildung, die eigentlich die Phasen der Zellproliferation und Matrix-Mineralisierung überlappte und mit einer allerdings geringeren Intensität bis zum Schluss aller durchgeführten 31-tägigen Experimente andauerte.



**Abb. 3.40**

„Mineralization lag time“ (mlt) und die drei Phasen des Mineralisierungsprozesses: **1** - Initiierungsphase, **2** - Progressionsphase, **3** - Plateauphase der Mineraleinlagerung. Humane osteogene, aus einer heterotopen Ossifikation (**A**) oder Knochenspongiosa (**B**) isolierte Zellen wurden in 48-Loch-Platten in mit 10 % HS und osteogenen Supplementen angereichertem  $\alpha$ MEM kultiviert. Medienwechsel wurde entweder zweimal (**A**) oder dreimal (**B**) in der Woche vorgenommen.

Von allen drei Etappen der In-vitro-Osteogenese ist der Prozess der Matrix-Mineralisierung am leichtesten abzugrenzen. Neben der von Bellows et al. [1992] postulierten Initiierungs- und Progressionsphase umfasst sie, wie die durchgeführten Experimente zeigten, auch eine abschließende Plateauphase, in der sich die Intensität der Mineraleinlagerung verringert (Abb. 3.40). Eine jede der drei Mineralisierungsphasen ist mit typischen



Veränderungen im  $\text{Ca}^{2+}$ -Verbrauch verbunden, sie kann aber auch durch bestimmte andere biochemische Parameter charakterisiert werden (Tabelle 3.11).

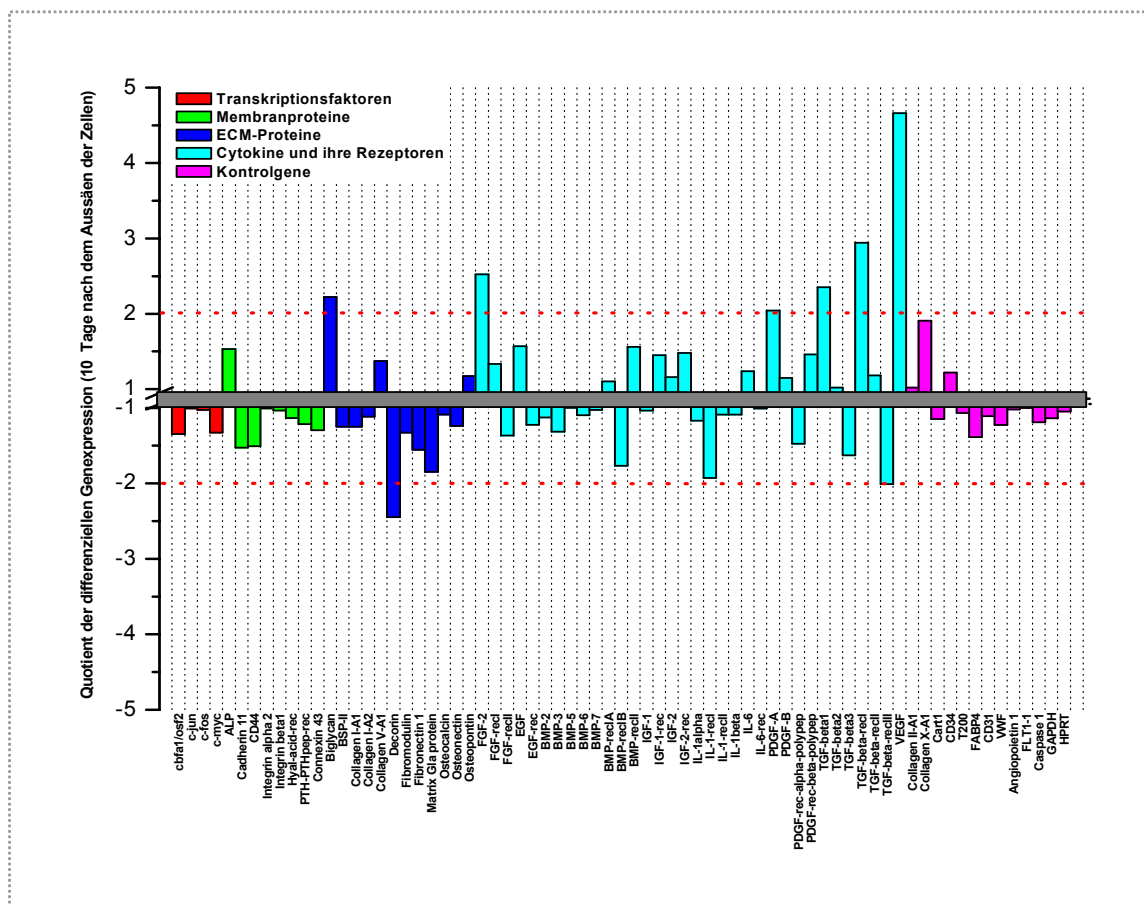
In einer In-vitro-Kultur ist eine nicht-invasive Ermittlung des Zellwachstums die eindeutig schwierigste Aufgabe. Da Glucoseverbrauch und Lactatproduktion stark von dem Entwicklungsstadium der Zellen bzw. von der Zusammensetzung der Zellkultur abhängig sind, liefern diese Parameter nur am Anfang des Experiments eine vergleichsweise zuverlässige Information über die Zunahme der Zellzahl (siehe 3.6.2). Eine Einschätzung des Zellwachstums ist in späteren Kultivierungsphasen daher nur in Kombination mit anderen zu analysierenden Parametern möglich und fordert darüber hinaus gute Kenntnisse über das proliferative und osteogene Potential des vorliegenden Zellmaterials. So könnte ein geringer Glucoseverbrauch zusammen mit einer niedrigen Intensität der Kollagen I-Synthese und niedriger ALP-Aktivität in Kulturen, die ansonsten eine ergiebige Kollagen I- und ALP-Expression zeigen, auf ein ungenügendes Zellwachstum und womöglich ungeeignete Kultivierungsbedingungen hindeuten. Es ist daher zu empfehlen die proliferativen und osteogenen Eigenschaften des frisch isolierten humanen Zellmaterials vor der Besiedlung der 3D-Trägergerüste in einer 2D-Kultur zu überprüfen.

#### **3.6.4 Bewertung der Informativität des entwickelten knochenspezifischen Microarrays und die Perspektiven seines Einsatzes im Bereich des Knochen-Tissue-Engineerings**

Zwar ist der entwickelte knochenspezifische Microarray wegen den hohen Analysekosten, der vergleichsweise geringen Reproduzierbarkeit der Experimente (in den meisten Microarray-Versuchen können nur die Quotienten der differentiellen Genexpression, die über einem Wert von 2,0 oder unter einem Wert von -2,0 liegen als statistisch relevant betrachtet werden) und der benötigten RNA-Isolierung für eine kontinuierliche, nicht-invasive Überwachung osteogener Zellkulturen zweifellos nicht geeignet. Die mit den Microarrays durchgeführten Experimente belegen allerdings, dass diese Analysemethode sehr hilfreich sein kann, etwa wenn Wege zur Optimierung der Zellkultivierung untersucht werden. Bei der Kultivierung osteogener Zellen unter unterschiedlichen Bedingungen liefern die mit der Microarray-Analyse gewonnenen Daten umfassende Informationen über den Zustand der Zellkulturen und geben Hinweise über mögliche Ursachen der registrierten Unterschiede (siehe 3.1.4, 3.3.2, 3.4.3). Die Analyse der differentiellen Genexpression gibt damit wertvolle Anregungen zu weiterführenden Experimenten.

Ein anderer, sehr interessanter Aspekt der Microarray-Analyse ist der Vergleich des Grads der Gen- und der Proteinexpression. Um einen genauen, detaillierten Einblick in den physiologischen Zustand der Zellkultur zu gewinnen, mussten die beiden Expressionsebenen stets miteinander verglichen werden. Leider ist diese Gegenüberstellung zumeist nur bei einer stark eingeschränkten Anzahl von Proteinen möglich. Dabei ist zu beachten, dass die Menge des synthetisierten Proteins dem

Expressionsgrad des dazugehörigen Gens genau entsprechen kann, aber nicht muss, da Reifung, Stabilität, Translation, Abbau der mRNA und Prozessierung, Sekretion, Stabilität und Aktivierung des Proteins Ereignisse sind, die die endgültige Konzentration des zu untersuchenden Eiweißes im extrazellulären Raum ebenfalls stark beeinflussen können.



**Abb. 3.41**

Ergebnisse der Analyse der differentiellen Genexpression. Die aus einer heterotopen Ossifikation oder Knochenspongiosa isolierten osteogenen Zellen wurden in mit 10 % HS und osteogenen Supplementen angereichertem  $\alpha$ MEM kultiviert. Die aus Knochenspongiosa isolierten Zellen der 6. Passage wurden beim durchgeführten Microarray-Experiment als Analyse, die aus einer heterotopen Ossifikation isolierten Zellen der 10. Passage als Referenz definiert. Die rot punktierte Linie kennzeichnet die Signifikanzgrenze der differentiellen Genexpression. Die Gesamt-RNA für die Microarray-Analyse wurde aus Flaschenkulturen (T25-Kulturflaschen) am 10. Tag des Experiments isoliert.

Der entwickelte knochenspezifische Microarray könnte im Bereich des Knochen-Tissue-Engineerings auch zur Charakterisierung der osteogenen Eigenschaften des isolierten Zellmaterials eingesetzt werden. Seine Anwendung wäre besonders dann von Nutzen, wenn die Zellen mit knochenbildendem Potential nicht aus dem Knochenmark, sondern z.B. aus perivaskulärem Gewebe, Fett- oder Muskelgewebe, isoliert werden. Mit Hilfe der Microarray-Analyse könnte untersucht werden, ob und wann diese Zellen anfangen die typischen osteogenen Marker zu exprimieren. Die Aufklärung der Beständigkeit der Expression knochenspezifischer Gene sowie die Ermittlung der Unterschiede in ihrem Expressionsgrad im Vergleich zu „normalem“ aus dem Knochenmark oder -gewebe isolierten Zellmaterial wären weitere sehr interessante Fragestellungen. Der größte Vorteil

der Microarray-Analyse gegenüber solchen Analysetechniken wie RT-PCR oder Durchflusszytometrie liegt in der Möglichkeit den Expressionsgrad einer Vielzahl relevanter Gene parallel, d.h. in einem Experiment, zu untersuchen sowie in dem vergleichsweise niedrigen Probenverbrauch.

Abbildung 3.41 zeigt die Ergebnisse eines Microarray-Experiments, in dem die Expression knochenspezifischer Gene in zwei unterschiedlichen Zellmaterialien, die aus Knochenspongiosa oder einer heterotopen Ossifikation isoliert wurden, charakterisiert und miteinander verglichen wurden. Diese beiden Zellmaterialien wurden in den meisten der durchgeführten Experimente eingesetzt. Bei der cDNA-Synthese wurde die aus den Knochenspongiosazellen der 6. Passage isolierte RNA als Analyse, die aus Zellen der 10. Passage einer heterotopen Ossifikation gewonnene RNA als Referenz definiert. Die berechneten Quotienten der differentiellen Genexpression zeigen so die Unterschiede im Expressionsgrad der untersuchten Gene in Knochenspongiosazellen auf. Die Gesamt-RNA für die Microarray-Analyse wurde zum gleichen Zeitpunkt, d.h. am 10. Tag nach dem Aussäen der Zellen isoliert. Parallel zur Microarray-Analyse wurde die Proliferation und die Differenzierung osteogener Zellen auch mit anderen, immunologischen und biochemischen Analysemethoden charakterisiert (Abb. 3.42).

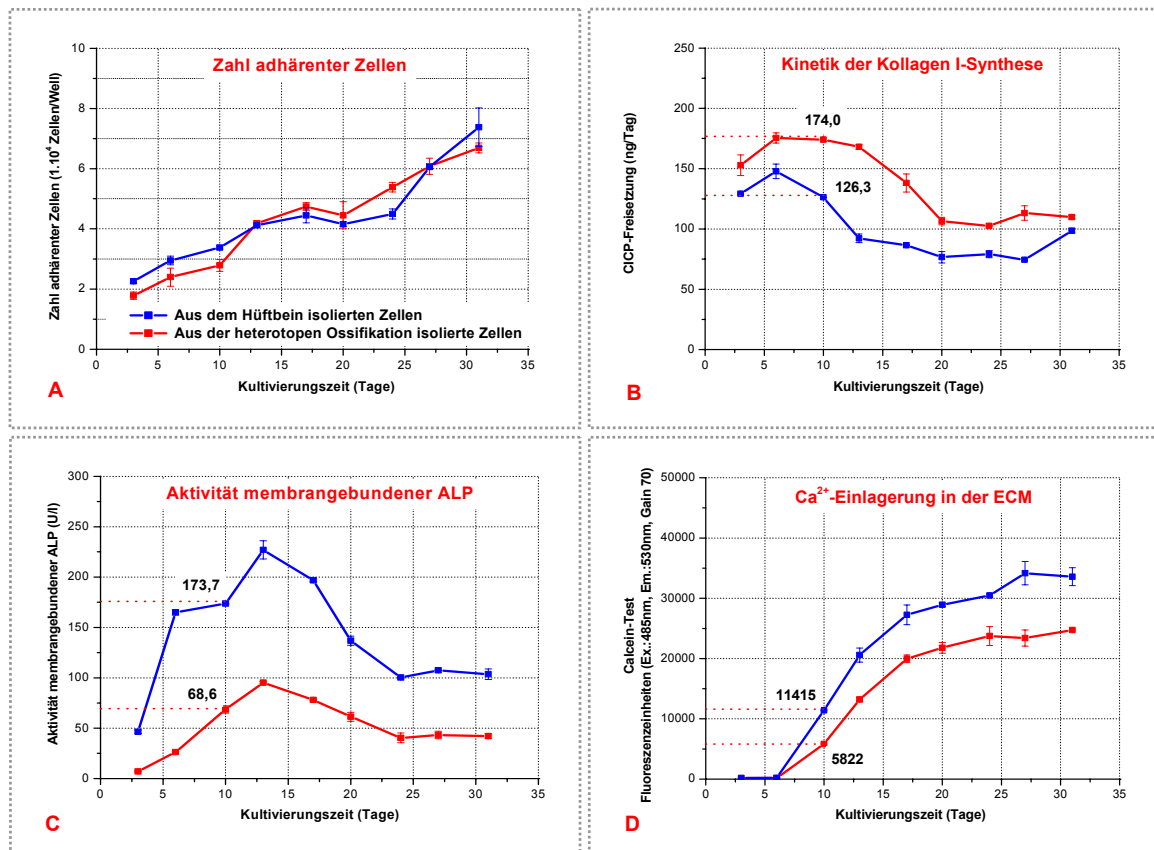
**Tabelle 3.12**

**Statistisch relevante Unterschiede im Expressionsgrad untersuchter Gene in osteogenen Zellen der Knochenspongiosa im Vergleich zu osteogenen Zellen einer heterotopen Ossifikation**

Nr.	Name des Gens in der NCBI-Datenbank und benutzte Abkürzung	Gennummer	Quotient
<u>ECM-Proteine</u>			
1.	<b>Biglycan (Biglycan)</b>	XM_042153	<b>+2,22</b>
2.	<b>Decorin (Decorin)</b>	XM_012239	<b>-2,45</b>
<u>Wachstums-, Differenzierungsfaktoren und ihre Rezeptoren</u>			
3.	<b>Fibroblast growth factor 2 (basic) (FGF-2)</b>	NM_002006	<b>+2,52</b>
4.	<b>Platelet-derived growth factor A-chain (PDGF-A)</b>	X03795	<b>+2,04</b>
5.	<b>Transforming growth factor, beta 1 (TGF-beta1)</b>	XM_030906	<b>+2,35</b>
6.	<b>Transforming growth factor, beta receptor I (TGF-beta-recl)</b>	XM_005591	<b>+2,94</b>
7.	<b>Transforming growth factor, beta receptor III (TGF-beta-recIII)</b>	XM_001924	<b>-2,01</b>
8.	<b>Vascular endothelial growth factor (VEGF)</b>	NM_003376	<b>+4,66</b>

Wie in Tabelle 3.12 und in der Abbildung 3.41 zu sehen ist, war in den Zellkulturen, die mit den aus Knochenspongiosa isolierten Zellen angelegt wurden, die Expression von lediglich 8 der 73 untersuchten Gene signifikant unterschiedlich. Nur eines dieser Gene, der VEGF, wurde in den aus der Spongiosa gewonnenen Zellen deutlich stärker transkribiert als in dem Zellmaterial, das aus einer heterotopen Ossifikation isoliert wurde. Wachstumsfaktor VEGF, der in vivo und in vitro auch von osteogenen Zellen produziert wird, fördert die Angiogenese,

d.h. die Migration und Proliferation von Endothelialzellen. Eine Reihe von physikalischen und chemischen Stimuli (z.B. Hypoxie und damit verbundene Ansäuerung des extrazellulären Milieus), einschließlich der pro-inflammatorischen Zytokine, PDGF, IGF-I, FGF-2, TGF- $\beta$ 1 steigern die VEGF-Produktion in osteogenen Zellen [Saadeh et al., 1999; Spector et al., 2000; Steinbrech et al., 2000]. Auch im konkreten Fall war die erhöhte Expression des VEGF-Gens mit einer leichten Zunahme der FGF-2-, PDGF-A-, TGF- $\beta$ 1-Transkription verbunden.



**Abb. 3.42**

Vergleich der Proliferation und Differenzierung humaner osteogener Zellen, die aus einer heterotopen Ossifikation (10. Passage) oder Knochenspongiosa (6. Passage) isoliert wurden. Die Zellen wurden in 48-Loch-Platten in mit 10 % HS und osteogenen Supplementen angereichertem  $\alpha$ MEM kultiviert. **A** – Zahl adhärenter Zellen; **B** – Kinetik der Kollagen I-Synthese (Kinetik der CICP-Freisetzung in den Kulturüberstand); **C** – Aktivität der membrangebundenen ALP; **D** – Ca<sup>2+</sup>-Einlagerung in der ECM (Calcein-Test).

Im Vergleich zu aus der heterotopen Ossifikation isolierten Zellen wiesen die aus Knochenspongiosa gewonnenen Zellen sehr ähnliche proliferative Eigenschaften auf. Während der Subkultivierung entsprach die mittlere Verdopplungszeit in Kulturen, die mit Zellen der heterotopen Ossifikation angelegt wurden,  $101,5 \pm 16,7$  h, in den Kulturen der Knochenspongiosazellen  $114,5 \pm 24,0$  h. Die Zellkulturen der Letzteren zeigten auf der Proteinexpressionsebene aber eine niedrigere Intensität der Kollagen I-Synthese, eine deutlich höhere ALP-Aktivität und damit eine schneller verlaufende Mineraleinlagerung (Abb. 3.42). Die Gegenüberstellung der Gen- und Proteinexpression, die bei 4 Genen

durchgeführt wurde (siehe Tab. 3.13), zeigte zwar keine genaue, jedoch eine richtungsweisende Übereinstimmung.

**Tabelle 3.13**

**Unterschiede im Grad der Gen- und Proteinexpression in osteogenen Zellen der Knochenspongiosa im Vergleich zu osteogenen Zellen einer heterotopen Ossifikation**

Nr.	Name des Gens in der NCBI-Datenbank	Quotient der differenziellen Genexpression	Quotient der differenziellen Proteinexpression
1.	Collagen, type I, alpha 1 ( <b>Coll1-A1</b> )	-1,25	-1,37
2.	Collagen, type I, alpha 2 ( <b>Coll1-A2</b> )	-1,12	
3.	Alkaline phosphatase, liver/bone/ kidney ( <b>ALP</b> )	+1,53	+2,53
4.	Biglycan	+2,22	<b>Ca<sup>2+</sup>-Einlagerung (Mineralisierungsgrad) = +1,96</b>

Die Analyse der differenziellen Genexpression mit dem entwickelten knochenspezifischen Microarray stellt damit eine wertvolle Methode zur detaillierten Charakterisierung des vorhandenen Zellmaterials und des Zustands der zu untersuchenden Zellkulturen dar.

## **4 Zusammenfassung und Ausblick**

In der vorliegenden Arbeit wurden die Bedingungen für eine In-vitro-Kultivierung primärer osteogener Humanzellen optimiert. Dafür wurde eine umfassende Untersuchung ihrer Proliferation und Differenzierung in drei häufig verwendeten Basalmedien (DMEM,  $\alpha$ MEM, RPMI 1640) und in dem in der Abteilung Zellkulturtechnik der GBF entwickelten ZKT-I-Medium durchgeführt. Anhand der gewonnenen Daten konnte gezeigt werden, dass die Wahl des Basalmediums einen deutlichen Einfluss auf die In-vitro-Osteogenese und insbesondere auf den Prozess der Matrix-Mineralisierung ausübt.

Der Vergleich der Zusammensetzung verwendeter Basalmedien und die Ergebnisse weiterer Experimente, in denen Kulturmedien mit unterschiedlichem  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt eingesetzt wurden, belegten, dass die Unterschiede im Mineralisierungsgrad der ECM und offensichtlich auch in der Differenzierungsgeschwindigkeit der Knochenvorläuferzellen in hohem Maße von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Medium abhängig sind. Über eine Calcium-Supplementierung kann demzufolge nicht nur der Prozess der Mineralisierung, sondern auch die Differenzierungsgeschwindigkeit bzw. die Anzahl früher Knochenvorläuferzellen in der jeweiligen Zellkultur beeinflusst werden.

Für die Kultivierung primärer humaner Knochenvorläuferzellen, ist ein zeitlich aufeinander folgender Einsatz von zwei Medien, d.h. eines Proliferationsmediums und eines Differenzierungsmediums von Vorteil. Die Vermehrung isolierter osteogener Zellen kann in einem Proliferationsmedium, z.B. ZKT-I, erfolgen, welches die Differenzierung der Knochenvorläuferzellen verlangsamt und dadurch den Erhalt einer viel größeren Anzahl früher Progenitorzellen sichert. Nach der Vermehrung der Vorläuferzellen, beispielsweise zur Besiedlung von 3D-Trägergerüsten, kann der Übergang zur Kultivierung in einem Differenzierungsmedium, etwa  $\alpha$ MEM erfolgen. In diesem Medium verbinden sich ein gutes Wachstum, d.h. eine nicht zu schnelle Ausdifferenzierung der Progenitorzellen, mit einem kontrollierten, ungestörten Verlauf der Mineraleinlagerung.

Es wurde ebenfalls dargelegt, dass ein mit Humanserum angereichertes Medium für die Kultivierung humaner osteogener Zellen zweifellos viel besser geeignet ist als ein mit FBS supplementiertes Medium. Die Anreicherung des Kulturmediums mit FBS anstatt mit Humanserum führt zu geringerer Adhäsion, schwächerem Wachstum und einer in ungewünschtem Maße verzögerten Differenzierung humaner Knochenvorläuferzellen. Außerdem könnte die Verwendung eines xenogenen Serums nach der Implantation der 3D-Trägergerüste auch zu immunologischen Abwehrreaktionen führen.

Ferner wurde das serumreduzierte Kultivierungsverfahren, welches im Rahmen des EU-Projektes „Tissue reactor“ für die Kultivierung osteogener Rattenzellen entwickelt wurde, an das humane Modellsystem angepasst und weiter optimiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung humaner osteogener Zellen im optimierten serumreduzierten Medium über einen beschränkten Zeitraum von maximal 2 Wochen und, im Gegensatz zu

Rattenzellen, nur unter einer kontinuierlichen Zugabe von Wachstumsfaktoren möglich ist. Die durchgeführten Experimente bestätigen eindeutig, dass das Hauptproblem des serumreduzierten Kultivierungsverfahrens im überhöhten Tempo der Zelldifferenzierung liegt. Dadurch wird in der betroffenen Zellkultur relativ schnell ein hoher Anteil an postmitotischen und sekretorisch viel inaktiveren Osteozyten erreicht. Dieses Ereignis könnte in der Zukunft allerdings auch in einem positiven Sinne genützt werden. So würde z.B. eine kurzzeitige Kultivierung von mit Knochenmarkszellen besiedelten Trägergerüsten in einem serumreduzierten Medium unmittelbar vor ihrer Implantation zu einer schnellen Zunahme der Anzahl von Präosteoblasten und reifen Osteoblasten führen. Diese osteogenen Zellen sind zu einer besonders intensiven Matrixprotein-Synthese befähigt und könnten damit die Effizienz der In-vivo-Osteogenese nach der Implantation steigern.

Die Optimierung des Verfahrens zur präzisen Bestimmung der optimalen Dosis von BMP-2, eines wichtigen osteoinduktiven Faktors, belegte, dass die von rhBMP-2 hervorgerufenen Effekte nicht nur von dessen Konzentration und Wirkungsdauer, sondern auch vom verwendeten Basalmedium und von der Präsenz anderer Zytokine bzw. Wachstumsfaktoren stark beeinflusst werden. Die Aufklärung des Mechanismus der beobachteten Wechselwirkung und der zeitlichen Abfolge des optimalen Einsatzes von Wachstumsfaktoren und BMP-2 bei der Kultivierung humaner knochenbildender Zellen ist eine interessante Fragestellung für weitere Forschungsvorhaben.

Verfahren, die die Steuerung der Proliferation und Differenzierung osteogener Zellen über die Zusammensetzung des Kulturmediums erlauben, sind allerdings noch weiter zu verbessern und auszubauen und könnten auf einer zeitabhängigen Zugabe von Zytokinen, Mineralien (z.B. Calcium) und Vitaminen (z.B. Vitamin D<sub>3</sub>) basieren.

Um eine Auswahl an Analysetechniken zusammenzustellen, die ein umfangreiches und zugleich nicht-invasives Monitoring osteogener Kulturen ermöglicht, war zuerst ein relativ breites Spektrum an biochemischen, immunologischen, molekularbiologischen und histologischen Analysemethoden zu etablieren, anzupassen oder neu zu entwickeln. Alle 18 benutzten Methoden wurden zunächst in 2D-Langzeitkulturen humaner osteogener Zellen auf ihre Informativität und Verlässlichkeit getestet. Aus der Gesamtheit der verwendeten Analysetechniken wurden sechs nicht-invasive Methoden ausgewählt, deren Einsatz für eine detaillierte und zuverlässige Überwachung von 2D- und voraussichtlich auch von 3D-Kulturen humaner osteogener Zellen ausreichend ist. Die selektierten Methoden - die Bestimmung des Glucoseverbrauchs und der Lactatproduktion, die Ermittlung der CICP-Freisetzung, der ALP-Aktivität, der LDH-Aktivität, der Aktivität der Caspasen 3 und 7 im Kulturüberstand und die Ermittlung des Ca<sup>2+</sup>-Verbrauchs - geben Informationen über das Wachstum, die Vitalität und den Differenzierungsprozess knochenbildender Zellen, und ermöglichen so den Einblick in den Verlauf der In-vitro-Osteogenese. Die endgültige Validierung der ausgewählten Analysemethoden müsste

allerdings in einem 3D-Kultivierungssystem erfolgen und könnte zum Thema einer weiteren Doktorarbeit bzw. eines weiteren Forschungsvorhabens werden.

Die Analyse der differentiellen Genexpression mit dem selbst entwickelten knochenspezifischen Microarray gibt Informationen über den Expressionsgrad von 73 relevanten Genen und stellt damit eine wertvolle Methode zur detaillierten Charakterisierung des vorhandenen Zellmaterials und des Zustands der zu untersuchenden Zellkulturen dar. Seine Anwendung wäre besonders hilfreich in Fällen, wo der Anstieg der Expression knochenrelevanter Gene in Vorläuferzellen untersucht wird, die nicht aus dem Knochenmark oder Knochengewebe, sondern z.B. aus perivaskulärem, Fett- oder Muskelgewebe isoliert wurden.



## **5 Abkürzungen**

ALP	<u>A</u> lkalische <u>P</u> hosphatase
ActR	<u>A</u> ctivin <u>R</u> ezeptor
ALK	<u>A</u> ctivin <u>R</u> eceptor- <u>L</u> ike <u>K</u> inase
AMV-RT	<u>A</u> vian <u>M</u> yeloblastosis <u>V</u> irus <u>R</u> everse <u>T</u> ranscriptase
BCA	<u>B</u> icinchoninic Acid (Bicinchoninsäure)
bFGF	<u>b</u> asic <u>F</u> ibroblast <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
BGJb	<u>B</u> iggers <u>G</u> watkin <u>J</u> udah Medium
BGP	<u>B</u> one <u>G</u> la <u>P</u> rotein ( auch Osteocalcin)
BI	<u>B</u> iotin
BMP	<u>B</u> one <u>M</u> orphogenetic <u>P</u> rotein
BMPR	<u>B</u> one <u>M</u> orphogenetic <u>P</u> rotein <u>R</u> eceptor
BSA	<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin
BSP	<u>B</u> one <u>S</u> ialoprotein
CaR	<u>C</u> alcium <u>R</u> ezeptor
CDMP	<u>C</u> artilage- <u>D</u> erived <u>M</u> orphogenetic <u>P</u> rotein
cDNA	<u>c</u> omplementary <u>D</u> N <u>A</u>
CFU-F	<u>C</u> olony <u>F</u> orming <u>U</u> nits-Fibroblast
CHO	<u>C</u> hinese <u>H</u> amster <u>O</u> vary
CICP	C-terminales Propeptid von Prokollagen I
Cx	<u>C</u> onnexin
Cy3	Indocarbocyanin
Cy5	Indodicarbocyanin
dATP	2'- <u>D</u> esoxy- <u>A</u> denin <u>t</u> riphosphat
dCTP	2'- <u>D</u> esoxy- <u>C</u> ytidin <u>t</u> riphosphat
dGTP	2'- <u>D</u> esoxy- <u>G</u> uanosin <u>t</u> riphosphat
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>m</u> odifiziertes <u>E</u> agle <u>M</u> edium
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
DNA	<u>D</u> esoxyribonucleic <u>A</u> cid
dsDNA	<u>d</u> oppelsträngige <u>D</u> N <u>A</u>
dTTP	2'- <u>D</u> esoxy- <u>T</u> hymidin <u>t</u> riphosphat
ECM	<u>E</u> xtracelluläre <u>M</u> atrix
ED <sub>50</sub>	<u>E</u> ffective <u>D</u> ose <u>50</u>
EGF	<u>E</u> pidermal <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
EGFR	<u>E</u> pidermal <u>G</u> rowth <u>F</u> actor <u>R</u> eceptor
FBS	<u>F</u> ötales <u>b</u> ovines <u>S</u> erum
FGF	<u>F</u> ibroblast <u>G</u> rowth <u>F</u> actor

FGFR	<u>F</u> ibroblast <u>G</u> rowth <u>F</u> actor <u>R</u> eceptor
FL	<u>F</u> luoresze <u>i</u> n
FN	<u>F</u> ibro <u>n</u> ectin
FW	<u>F</u> ormula <u>W</u> eight
GAPDH	<u>G</u> lycerinaldehyd-3- <u>P</u> hosphat- <u>D</u> ehydrogenase
GC-Gehalt	<u>G</u> uanosin/ <u>C</u> ytidin- <u>G</u> ehalt
GDF	<u>G</u> rowth and <u>D</u> ifferentiation <u>F</u> actor
Gla-Gruppen	$\gamma$ -Carboxyglutaminsäure-Gruppen
Gla-OC	Carboxyliertes <u>O</u> steo <u>c</u> alcin
Glu-OC	Nichtcarboxyliertes <u>O</u> steo <u>c</u> alcin
G-Proteine	GTPase activating proteins
HPRT	<u>H</u> ypoxanthin- <u>P</u> hosphoribosyl- <u>T</u> ransferase
HRP	<u>H</u> orseradish <u>P</u> eroxidase (Meerrettichperoxidase)
HS	<u>H</u> umanes <u>S</u> erum
Ig	<u>I</u> mmunoglobulin
IGF	<u>I</u> nsulin-like <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
IgG	<u>I</u> mmunoglobulin <u>G</u>
IL	<u>I</u> nterleukin
IL-1ra	<u>IL</u> -1 receptor antagonist
IL-1RAcP	<u>IL</u> -1 Receptor-Associated Protein
IMDM	<u>I</u> scove's modifiziertes <u>D</u> ulbecco's <u>M</u> edium
ITA	<u>I</u> nsulin + <u>T</u> ransferrin + <u>A</u> lbumin
JAK	Proteinkinase vom Janus-Typ
kb	<u>K</u> ilobasen
LAP	<u>L</u> atency- <u>A</u> ssociated <u>P</u> eptide
LDH	<u>L</u> actat <u>d</u> ehydrogenase
LTBP	<u>L</u> atent <u>T</u> GF- $\beta$ <u>B</u> inding <u>P</u> rotein
MAPK (Erk)	<u>M</u> itogen- <u>A</u> ctivated <u>P</u> rotein <u>K</u> inase ( <u>E</u> xtracellular signal-regulated protein kinase)
MEM	<u>M</u> inimum <u>E</u> ssential <u>M</u> edium
MGP	<u>M</u> atrix <u>G</u> la <u>P</u> rotein
MIS	<u>M</u> üllerian-Inhibiting <u>S</u> ubstance
M-MLV-RT	<u>M</u> oloney <u>M</u> urine <u>L</u> eukemia <u>V</u> irus <u>R</u> everse <u>T</u> ranscriptase
MPC	<u>M</u> esenchymal <u>P</u> recursor <u>C</u> ells (mesenchymale Progenitorzellen)
mRNA	<u>m</u> essenger <u>R</u> NA
MSC	<u>M</u> esenchymal <u>S</u> tem <u>C</u> ells (mesenchymale Stammzellen)
Mtw.	<u>M</u> ittelwert
NADH	<u>N</u> icotinamid- <u>A</u> denin <u>D</u> inucleotid- <u>H</u> ydroeen

---

NCBI	<u>N</u> ational <u>C</u> enter for <u>B</u> iot <u>e</u> chnology <u>I</u> nformation (USA)
NF-kB	<u>N</u> uclear <u>F</u> actor- <u>k</u> B
OC	<u>O</u> steo <u>c</u> alcin
ON	<u>O</u> steo <u>n</u> ectin
OP	<u>O</u> steo <u>p</u> ontin
OP-1	<u>O</u> steogenic <u>P</u> rotein-1
ORF	<u>O</u> pen <u>R</u> ead <u>e</u> ng <u>F</u> rame
PBS	<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PDGF	<u>P</u> latelet- <u>D</u> erived <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
PGE2	<u>P</u> rostaglandin <u>E</u> 2
PI	<u>P</u> hosphatidyl <u>i</u> nositol
P <sub>i</sub>	Anorganisches Phosphat
PTH	<u>P</u> ara <u>t</u> hyroid <u>H</u> ormone (Parathormon)
PTH/PTHrP	<u>P</u> ara <u>t</u> hyroid <u>H</u> ormone/ <u>P</u> ara <u>t</u> hyroid <u>H</u> ormone- <u>r</u> elated <u>P</u> eptide
RAS	GTP-bindendes Protein Ras
rhBMP-2	<u>r</u> ecombinant <u>h</u> uman <u>BMP-2</u> (rekombinantes humanes BMP-2)
RNA	<u>R</u> ibo <u>n</u> ucleic <u>A</u> cid
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	<u>R</u> everse <u>T</u> ranskriptase
SDS	<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate
sIL-6R	<u>s</u> oluble <u>IL-6</u> <u>R</u> eceptor
SSC	<u>S</u> aline- <u>S</u> odium <u>C</u> itrate
STAT	<u>S</u> ignal <u>T</u> ransducer and <u>A</u> ctivator of <u>T</u> ranscription
Stdabw.	<u>S</u> tandard <u>a</u> b <u>w</u> eichung
TE-Puffer	<u>T</u> ris- <u>E</u> DTA-Puffer
TGF- $\alpha$	<u>T</u> ransforming <u>G</u> rowth <u>F</u> actor <u>a</u> l <u>a</u>
TGF- $\beta$	<u>T</u> ransforming <u>G</u> rowth <u>F</u> actor <u>b</u> e <u>t</u> a
TMB	<u>T</u> etra <u>m</u> ethyl <u>b</u> enzidin
T $\beta$ R	<u>I</u> GF- <u><math>\beta</math></u> - <u>R</u> ezeptor
UTR	<u>U</u> n <u>t</u> ranslated <u>R</u> egion
2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional

## 6 Literaturverzeichnis

- Andrew J.G., Hoyland J.A., Freemont A.J., Marsh D.R. (1995). Platelet-derived growth factor expression in normally healing human fractures. *Bone*. **16**, 455-460.
- Anselme K., Broux O., Noel B., Bouxin B., Bascoulegue G., Dudermel A.F., Bianchi F., Jeanfils J., Hardouin P. (2002). In vitro control of human bone marrow stromal cells for bone tissue engineering. *Tissue Eng*. **8**(6), 941-953.
- Aubin J.E. Advances in the osteoblast lineage. (1998a). *Biochem Cell Biol*. **76**, 899-910.
- Aubin J.E. (1998b). Bone stem cells. *J Cell Biochem*. **30/31**(25<sup>th</sup> Anniversary Issue Supplements), 73-82.
- Aubin J.E. (2000). Osteogenic cell differentiation. In: Davies J.E. (eds.) 'Bone engineering', em<sup>2</sup> Inc., Toronto, 13-30.
- Aubin J.E. (2001). Regulation of osteoblast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord*. **2**, 81-94.
- Aubin J.E. Advances in the osteoblast lineage. (1998a). *Biochem Cell Biol*. **76**, 899-910.
- Aubin J.E., Liu F. (1996). The osteoblast lineage. In: Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G. A. (eds.) 'Principles of Bone Biology', Acad. Press, New York, 51-67.
- Bahamonde M.E., Lyons K.M. (2001). BMP3: to be or not to be a BMP. *J Bone Joint Surg Am*. **83-A** (Suppl. 1), S1-56-S1-62.
- Barry F.P., Murphy J.M. (2004). Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. **36**, 568-584.
- Barthold M. (2003). Züchtung primärer osteogener Zellen auf neuartigen Gerüststrukturen in Kleinfementen zur Herstellung von Knochenimplantaten in vitro. Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften vorgelegt an der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät der Technischen Universität Carolo-Vilhelmina zu Braunschweig.
- Barthold M., Mayer H., Jäger V. (2001). Cultivation of primary osteogenic cells in serum-reduced or serum-free culture media: attachment, proliferation and differentiation. In: Lindner-Olsson E., Chatzissavidou N., Lüllau E. (eds.) 'Animal cell technology: From target to market'. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 581-583.
- Beck A. (2002). Entwicklung von massenspektrometrischen und chromatographischen Mikro-Methoden zur Analyse von Proteinphosphorylierungen. Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften.
- Bellido T., Borba V.Z.C., Roberson P., Manolagas S.C. (1997). Activation of the janus Kinase/STAT (signal transducer and activator of transcription) signal transduction pathway by interleukin-6-type cytokines promotes osteoblast differentiation. *Endocrinology*. **138**(9), 3666-3676.
- Bellows C.G., Heersche J.N., Aubin J.E. (1992). Inorganic phosphate added exogenously or released from beta-glycerophosphate initiates mineralization of osteoid nodules in vitro. *J Bone Miner Res*. **17**(1), 15-29.
- Bennet J.H., Moffatt S., Horton M. (2001). Cell adhesion molecules in human osteoblasts: structure and function. *Histol Histopathol*. **16**, 603-611.
- Beresford J.N. (1989). Osteogenic stem cells and the stromal system of bone marrow. *Clin Orthop Rel Res*. **240**, 270-280.
- Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., Robey P.G. (2001). Bone marrow stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*. **19**, 180-192.
- Blumberg P., Brenner R., Budny S., Kresse H. (1997). Increased turnover of small proteoglycans synthesized by human osteoblasts during cultivation with ascorbate and  $\beta$ -glycerophosphate. *Calcif Tissue Int*. **60**, 554-560.
- Bonassar L.J., Trippel S.B. (1997). Interaction of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I in the regulation of growth plate chondrocytes. *Exp Cell Res*. **234**, 1-6.
- Bone as a tissue. In Gray's Anatomy, Churchill Livingstone, 1995, 452-484.
- Bonewald L.F. (1996). Transforming growth factor. In: Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G. A. (eds.) 'Principles of Bone Biology', Acad. Press, New York, 647-659.

- Bootman M.D., Lipp P., Berridge M.J. (2001). The organization and functions of local  $\text{Ca}^{2+}$  signals. *J Cell Science*. **114**, 2213-2222.
- Boskey A.L. (1991). The role of extracellular matrix components in dentin mineralization. *Crit Rev Oral Biol Med*. **2(3)**, 369-387.
- Boskey A.L. (1996). Matrix proteins and mineralization: an overview. *Connect Tissue Res*. **35(1-4)**, 357-363.
- Boskey A.L. (1998). Biomineralization: conflicts, challenges, and opportunities. *J Cell Biochem. Suppl*. **30/31**, 83-91.
- Boskey A.L. (2003). Biomineralization: an overview. *Connect Tissue Res*. **44(Suppl. 1)**, 5-9.
- Boskey A.L., Paschalis E. (2000). Matrix proteins and biomineralization. In: Davies J.E. (eds.) 'Bone engineering', em<sup>2</sup> Inc., Toronto, 44-62.
- Boyan B.D., Schwartz Z., Boskey A.L. (2000). The importance of mineral in bone and mineral research. *Bone*. **27(3)**, 341-342.
- Boyce F.B. Role of Apoptosis in Local Regulation. In: Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G. A. (eds.) 'Principles of Bone Biology', Acad. Press, New York, 739-753, 1996.
- Brazma A., Vilo J. (2001). Gene expression data analysis. *Microbes and Infect*. **3**, 823-829.
- Brighton C.T., Hunt R.M. (1991). Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. *J Bone Joint Surg*. **73 A**, 832-847.
- Bruder S.P., Fox B.S. (1999). Tissue engineering of bone. *Clin Orthop Relat Res*. **367S**, S68-S83.
- Bruder S.P., Horowitz M.C., Mosca J.D., Haynesworth S.E. (1997a). Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone*. **21(3)**, 225-235.
- Bruder S.P., Jaiswal N., Haynesworth S.E. (1997b). Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem*. **64**, 278-294.
- Bruder S.P., Kraus K.H., Goldberg V.M., Kadiyala S. (1998). The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am*. **80(7)**, 985-996.
- Bruinink A., Tobler U., Halg M., Grunert J (2004). Effects of serum and serum, heat-inactivation on human bone derived osteoblast progenitor cells. *J Mater Sci Mater Med*. **15**, 497-501.
- Buckwalter J.A., Glimcher M.D., Cooper R.E., Recker R. (1995a). Bone biology, part I: structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *J Bone Joint Surg*. **77-A (8)**, 1256-1275.
- Buckwalter J.A., Glimcher M.D., Cooper R.E., Recker R. (1995b). Bone biology, Part II: formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. *J Bone Joint Surg*. **77-A (8)**, 1276-1289.
- Butler W.T., Ridall A.L., McKee M.D. (1996). Osteopontin. In: Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G. A. (eds.) 'Principles of Bone Biology', Acad. Press, New York, 167-178.
- Canalis E., Economides A.N., Gazzerro E. (2003). Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev*. **24(2)**, 218-235.
- Cancedda R., Dozin B., Giannoni P., Quarto R. (2003). Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol*. **22**, 81-91.
- Candelieri G.A., Liu F., Aubin J.E. (2001). Individual osteoblasts in the developing calvaria express different gene repertoires. *Bone*. **28(4)**, 351-361.
- Canfield A.E., Doherty M.J., Ashton B.A. (2000). Osteogenic potential of vascular pericytes. In: Davies J.E. (eds.) 'Bone engineering', em<sup>2</sup> Inc., Toronto, 13-30.
- Caplan A.I., Bruder S.P. (2001). Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med*. **7 (6)**, 259-264.
- Caverzasio J., Bonjour J.P. (1996). Characteristics and regulation of  $\text{P}_i$  transport in osteogenic cells for bone metabolism. *Kidney Int*. **49(4)**, 975-980.
- Celeste A.J., Iannazzi J.A., Taylor R.C., Hewick R.M., Rosen V., Wang E.A., Wozney J.M. (1990). Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci USA*. **87(24)**, 9843-9847.

- Centrella M., Casinghino S., Kim J., Pham T., Rosen V., Wozney J., McCarthy T.L. (1995). Independent changes in type I and type II receptors for transforming growth factor  $\beta$  induced by bone morphogenetic protein 2 parallel expression of the osteoblast phenotype. *Mol Cell Biol.* **15**(6), 3273-3281.
- Centrella M., Ji C., McCarthy T.L. (1998). Control of TGF-beta receptor expression in bone. *Front Biosci.* **3**, 113-124.
- Chan S.Y., Wong R.W.C. (2000). Expression of epidermal growth factor in transgenic mice causes growth retardation. *J Biol Chem.* **275**(49), 38693-38698.
- Chang W., Tu Ch., Chen T.H., Komuves L., Oda Y., Pratt S.A., Miller S., Shoback D. (1999). Expression and signal transduction of calcium-sensing receptors in cartilage and bone. *Endocrinology.* **140**(12), 5883-5893.
- Chapekar M.S. (2000). Tissue engineering: challenges and opportunities. *J Biomed Mat Res.* **53**, 617-620.
- Chaudhary L.R., Hofmeister A.M., Hruska K.A. (2003). Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation. *Bone.* **34**, 402-411.
- Chauveau C., Devedjian J.C., Blary M.C., Delecourt C., Hardouin P., Jeanfils J., Broux O. (2004). Gene expression in human osteoblastic cells from normal and heterotopic ossification. *Exp Mol Pathol.* **76**(1), 37-43.
- Chen J.B., Yu Y., Nicklin S., Stephens P.C., Walsh W.R. In vitro osteoblast characteristics of adult human adipose derived cells. Materials of 7<sup>th</sup> World Biomaterials Congress, 904.
- Cheng H., Jiang W., Phillips F.M., Haydon R.C., Peng Y., Zhou L., Luu H.H., An N., Breyer B., Vanichakarn P., Szatkowski J.P., Park J.Y., He T.C. (2003). Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am.* **85-A**(8), 1544-1552.
- Cheng S.L., Lecanda F., Davidson M.K., Warlow P.M., Zhang S.F., Zhang L., Suzuki S., St John T., Civitelli R. (1998). Human osteoblasts express a repertoire of cadherins, which are critical for BMP-2-induced osteogenic differentiation. *J Bone Miner Res.* **13**, 633-644.
- Cheng S.L., Yang J.W., Rifas L., Zhang S.F., Avioli L.V. (1994). Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology.* **134**(1), 277-286.
- Chesney J., Bucala R. (2000). Peripheral blood fibrocytes: mesenchymal precursor cells and the pathogenesis of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep.* **2**(6), 501-505.
- Chomczynski P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cells and tissue samples. *Biotechniques.* **15**(3), 532-534, 536-537.
- Chung C.H., Golub E.E., Forbes E., Tokuoka T., Shapiro I.M. (1992). Mechanism of action of beta-glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcif Tissue Int.* **51**(4), 305-311.
- Coelho M.J., Fernandes M.H. (2000a). Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells in  $\alpha$ -MEM and in DMEM. *Biomaterials.* **21**, 1087-1094.
- Coelho M.J., Fernandes M.H. (2000b). Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid,  $\beta$ -glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials.* **21**, 1095-1102.
- Conolly J.F. (1995). Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin Orthop Relat Res.* **313**, 8-18.
- Conolly J.F., Guse R., Tiedeman J., Dehne R. (1991). Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions. *Clin Orthop Relat Res.* **266**, 259-270.
- Cornish J., Grey A., Callon K.E., Naot D., Hill B.L., Lin C.Q.X., Balchin L.M., Reid I.R. (2004). Shared pathways of osteoblast mitogenesis induced by amylin, adrenomedullin, and IGF-1. *Biochem Biophys Res Commun.* **318**, 240-246.
- Daluiski A., Engstrand T., Bahamonde M.E., Gamer L.W., Agius E., Stevenson S.L., Cox K., Rosen V., Lyons K.M. (2001). Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nat Genet.* **27**(1), 84-88.
- Damsky C.H. (1999). Extracellular matrix-integrin interactions in osteoblast function and tissue remodeling. *Bone.* **25**(1), 95-96.

- Davies J.E., Hosseini M.M. (2000). Histodynamics of endosseous wound healing. In: Davies J.E. (eds.) 'Bone engineering', em<sup>2</sup> Inc., Toronto, 1-14.
- Debias F., Lemonnier J., Hay E., Delannoy P., Caverzasio J., Marie P.J. (2001). Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) increases N-cadherin expression through protein kinase C and Src-kinase pathways in human calvaria osteoblasts. *J Cell Biochem.* **81**, 68-81.
- Diefenderfer D.L., Osyczka A.M., Reilly G.C., Leboy P.S. (2003). BMP responsiveness in human mesenchymal stem cells. *Connect Tissue Res.* **44(Suppl.1)**, 305-311.
- Donner H., Paul H., Weber J., Bell R., Drescher B. (2001). Entwicklung von Pan® Oligonukleotid-Microarrays in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biospektrum.* **2**, 165-168.
- Doyle A., Griffiths J.B. *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology.* John Wiley & Sons Ltd., 1998.
- Dragoo J.L., Choi J.Y., Lieberman J.R., Huang J., Zuk P.A., Zhang J.M., Hedrick M.H., Benhaim P. (2003). Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *J Orthop Res.* **21**, 622-629.
- Ducy P., Karsenty G. (1996). Skeletal Gla proteins: gene structure, regulation of expression, and function. In: Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G. A. (eds.) 'Principles of Bone Biology', Acad. Press, New York, 183-196.
- Ducy P., Karsenty G. (1998). Genetic control of cell differentiation in the skeleton. *Curr Opin Cell Biol.* **10**, 614-619.
- Ducy P., Schinke T., Karsenty G. (2000). The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science.* **289**, 1501-1504.
- Ducy P., Zhang R., Geoffroy V., Ridall A.L., Karsenty G. (1997). *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell.* **89**, 747-754.
- Dvorak M.M., Riccardi D. (2004).  $Ca^{2+}$  as an extracellular signal in bone. *Cell Calcium.* **35**, 249-255.
- Ebendal T., Bengtsson H., Söderström S. (1998). Bone morphogenetic proteins and their receptors: potential function in the brain. *J Neurosci Res.* **51**, 139-146.
- Einhorn T.A. (1996). Biomechanics of bone. In: Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G. A. (eds.) 'Principles of Bone Biology', Acad. Press, New York, 25-37.
- Erices A., Conget P., Minguell J.J. (2000). Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol.* **109**, 235-242.
- Erlebacher A., Derynck R. (1996). Increased expression of TGF-beta2 in osteoblasts results in an osteoporosis-like phenotype. *J Cell Biol.* **132**, 195-210.
- Erlebacher A., Filvaroff E.H., Ye J.Q., Derynck R. (1998). Osteoblastic responses to TGF-β during bone remodeling. *Mol Biol Cell.* **9**, 1903-1918.
- Erschler W.B., Keller E.T. (2000). Age-associated increased interleukin-6 gene Expression, late-life diseases, and frailty. *Annu Rev. Med.* **51**, 245-270.
- Eyre D.R. (1996). Biochemical basis of collagen metabolites as bone turnover markers. In: Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G. A. (eds.) 'Principles of Bone Biology', Acad. Press, New York, 143-153.
- Fagenholz P.J., Warren S.M., Greenwald J.A., Bouletreau P.J., Spector J.A., Crisera F.E., Longaker M.T. (2001). Osteoblast gene expression is differentially regulated by TGF-beta isoforms. *J Craniofac Surg.* **12 (2)**, 183-190.
- Fargali S., Barthold M., Rodhe M., Majore I., Jäger V. (2005). In vitro cultivation of rabbit mesenchymal stromal cells on 3D bioresorbable calcium phosphate scaffolds for the generation of bone tissue implants. In: Godia F., Fussenegger M. (eds.) 'Animal cell Technology Meets Genomics', Springer Dordrecht, Netherlands, 241-243.
- Friedenstein A.J., Gorskaja J.F., Kulagina N.N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse haematopoietic organs. *Exp Haematol.* **4**, 267-274.
- Fromigué O., Marie P.J., Lomri A. (1998). Bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-β2 interact to modulate human bone marrow stromal cell proliferation and differentiation. *J Cell Biochem.* **68**, 411-426.
- Fukuda K. (2003). Application of mesenchymal stem cells for the regeneration of cardiomyocyte and its use for cell transplantation therapy. *Human Cell.* **16(3)**, 83-94.

- Gilboa L., Nohe A., Geissendörfer T., Sebald W., Henis Y. I., Knaus P. (2000). Bone morphogenetic protein receptor complexes on the surface of live cells: a new oligomerization mode for serine/threonine kinase receptors. *Mol Biol Cell*. **11**, 1023-1035.
- Gilboa L., Wells R.G., Lodish H.F., Henis Y. I. (1998). Oligomeric structure of type I and type II transforming growth factor  $\beta$  receptors: homodimers form in the ER and persist at the Plasma Membrane. *J Cell Biol*. **140(4)**, 767-777.
- Globus R.K., Doty S.B., Lull J.C., Holmuhamedov E., Humphries M.J., Damsky C.H. (1998). Fibronectin is a survival factor for differentiated osteoblasts. *J Cell Science*. **111**, 1385-1393.
- Gowen M., Wood D.D., Ihrie W.F., McGuire M.K.B., Russel R.G.G. (1983). An interleukin-1 like factor stimulates bone resorption in vitro. *Nature*. **306**, 378-380.
- Grigoriadis A.E., Heersche J.N.M., Aubin J.E. (1988). Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J Cell Biol*. **106**, 2139-2151.
- Grigoriadis A.E., Wang Z.Q., Wagner E.F. (1995). Fos and bone cell development: lessons from a nuclear Oncogene. *Trends Genet*. **11(11)**, 436-441.
- Grigoriadis A.E., Wang Z.Q., Wagner E.F. (1996). Regulation of bone cell differentiation and bone remodeling by the c-fos/AP-1 transcription factor. In: Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G. A. (eds.) 'Principles of Bone Biology', Acad. Press, New York, 15-24.
- Gronthos S., Simmons P.J. (1995). The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro. *Blood*. **85(4)**, 929-940.
- Gronthos S., Simmons P.J., Graves S.E., Robey P.G. (2001). Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursors and the extracellular matrix. *Bone*. **28(2)**, 174-181.
- Gronthos S., Stewart K., Graves S.E., Hay S., Simmons P. J. (1997). Integrin expression and function on human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res*. **12(8)**, 1189-1197.
- Guo Z., Yang J., Liu X., Li X., Hou C., Tang P.H., Mao N. (2001). Biological features of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Chin Med J (Engl)*. **114(9)**, 950-953.
- Hale L.V., Ma Y.F., Santerre R.F. (2000). Semi-quantitative fluorescence analysis of calcein binding as a measurement of in vitro mineralization. *Calcif Tissue Int*. **67**, 80-84.
- Hankey D.P., McCabe R.E., Doherty M.J., Nolan P C., McAlinden M.G., Nelson J., Wilson D.J. (2001). Enhancement of human osteoblast proliferation and phenotypic expression when cultured in human serum. *Acta Orthop Scand*. **72(4)**, 395-403.
- Hay E., Hott M., Graulet A.M., Lomri A., Marie P.J. (1999). Effects of bone morphogenetic protein-2 on human neonatal calvaria cell differentiation. *J Cell Biochem*. **72**, 81-93.
- Hay E., Lemonnier J., Fromigue O., Marie P.J. (2001). Bone morphogenetic protein-2 promotes osteoblast apoptosis through a smad-independent, protein kinase C-dependent signaling pathway. *J Biol Chem*. **276(31)**, 29028-29036.
- Hay E., Lemonnier J., Modrowski D., Lomri A., Lasmoles F., Marie P.J. (2000). N- and E-cadherin mediate early human calvaria osteoblast differentiation promoted by bone morphogenetic protein-2. *J Cell Physiol*. **183**, 17-128.
- Haynesworth S.E., Goshima J., Goldberg V.M., Caplan A.I. (1991). Characterization of cells with osteogenic potential from human bone marrow. *Bone*. **13**, 81-88.
- Heinegård D., Olberg A. (1989). Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J*. **3**, 2042-2051.
- Heldin C.H., Ostman A., Rönnstrand L. (1998). Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta*. **1378**, F79-F113.
- Henthorn P. S. (1996). Alkaline phosphatase. In: Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G. A. (eds.) 'Principles of Bone Biology', Acad. Press, New York, 197-205.
- Hill P.A., Tumner A., Meikle M.C. (1997). Multiple extracellular signals promote osteoblast survival and apoptosis. *Endocrinology*. **138(9)**, 3849-3858.
- Hollinger J.O., Brekke J., Gruskin E., Lee D. (1996). Role of bone substitutes. *Clin Orthop Relat Res*. **324**, 55-65.



- Horner A., Bord S., Kemp P., Grainger D., Compston J.E. (1996). Distribution of platelet-derived growth factor (PDGF) A chain mRNA, protein, and PDGF-  $\alpha$ -receptor in rapidly forming human bone. *Bone*. **19(4)**, 353-362.
- Horner A., Kemp P., Summers C., Bord S., Bishop N.J., Kelsall A.W., Coleman N., Compston J.E. (1998). Expression and distribution of transforming growth factor- $\beta$  and their signaling receptors in growing human bone. *Bone*. **23(2)**, 95-102.
- Horowitz M.C., Lorenzo J.A. (1996). Local regulators of bone: IL-1, TNF, lymphotoxin, interferon- $\gamma$ , IL-8, IL-10, IL-4, the LIF/IL-6 family, and additional cytokines. In: Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G. A. (eds.) 'Principles of Bone Biology', Acad. Press, New York, 687-700.
- Horton M.A., Townsend P., Nesbitt S. (1996). Cell surface attachment molecules in bone. In: Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G. A. (eds.) 'Principles of Bone Biology', Acad. Press, New York, 217-229.
- Huang Z., Cheng S.L., Slatopolsky E. (2001). Sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway is required for extracellular calcium stimulation of human osteoblast proliferation. *J Biol Chem*. **276(24)**, 21351-21358.
- Hughes D.E., Wright K.R., Mundy G.R., Boyce B.F. (1994). TGF $\beta$ 1 induces osteoclast apoptosis in vitro. *J Bone Miner Res*. **9(Suppl.1)**, 71-76.
- Hui M., Hu M., Tenenbaum H.C. (1993). Changes in cell adhesion and cell proliferation are associated with expression of tissue non-specific alkaline phosphatase. *Cell Tissue Res*. **274**, 429-437.
- Hung S.C.H., Chen N.J., Hsien S.L., Li H., Ma H. L., Lo W.H. (2002). Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem cells*. **20**, 249-258.
- Hunter I., McGregor D., Robins S.P. (2001). Caspase dependent cleavage of cadherins and catenins during osteoblast apoptosis. *J Bone Miner Res*. **16(3)**, 466-477.
- Ishidou Y., Kitajima I., Obama H., Maruyama I., Murata F., Imamura T., Yamada N., Dijke P.T., Miyazono K., Sakou T. (1995). Enhanced expression of type I receptors for bone morphogenetic proteins during bone formation. *J Bone Miner Res*. **10(11)**, 1651-1659.
- Israel D.I., Nove J., Kerns K.M., Kaufman R.J., Rosen V., Cox K.A., Wozney J.M. (1996). Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo. *Growth Factors*. **13(3-4)**, 291-300.
- Itoh S., Itoh F., Goumans M.J., Dijke P. (2000). Signaling of transforming growth factor  $\beta$  family members through Smad proteins. *Eur J Biochem*. **267**, 6954-6967.
- Jadlowiec J.A., Celil A.B., Holliger J.O. (2003). Bone tissue engineering: recent advances and promising therapeutic agents. *Expert Opin Biol Ther*. **3(3)**, 409-423.
- Jahnen-Dechent W. (2004). Regulation der biologischen Calcifizierung. *Biospektrum*. **3**, 254-257.
- Jaiswal N., Haynesworth S., Caplan A.I., Bruder S.P. (1997). Osteogenic differentiation of purified culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*. **64**, 295-312.
- Jilka R.L., Weinstein R.S., Bellido T., Parfitt A.M., Manolagas S.C. (1998). Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res*. **13(5)**, 793-802.
- Johnson K.D., Frierson K.E., Keller T.S., Cook C., Scheinberg R., Zerwekh J., Meyers L., Sciadini M. F. (1996). Porous ceramics as bone graft substitutes in long bone defects: a biomechanical, histological, and radiographic analysis. *J Orthop Res*. **14(3)**, 351-369.
- Joyner C.J., Bennet A., Triffitt J.T. (1997). Identification and enrichment of human osteoprogenitor cells by using differentiation stage-specific monoclonal antibodies. *Bone*. **21(1)**, 1-6.
- Kalajzic I., Kalajzic Z., Hurley M.M., Lichtler A.C., Rowe D.W. (2003). Stage specific inhibition of osteoblast lineage differentiation by FGF-2 and noggin. *J Cell Biochem*. **88**, 1168-1176.
- Kang Q., Sun M.H., Cheng H., Peng Y., Montag A.G., Deyrup A.T., Jiang W., Luu H.H., Luo J., Szatkowski J.P., Vanichakarn P., Park J.Y., Li Y., Haydon R.C., He T.C. (2004). Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. *Gene Ther*. **11(17)**, 1312-1320.
- Karsenty G., Ducy P., Starbuck M., Priemel M., Shen J., Geoffroy V., Amling M. (1999). Cbfa1 as a regulator of osteoblast differentiation and function. *Bone*. **25**, 107-108.

- Kassem M., Kveiborg M., Eriksen E.F. (2000). Production and action of transforming growth factor-beta in human osteoblast cultures: dependence on cell differentiation modulation by calcitriol. *Eur J Clin Invest.* **30(5)**, 429-437.
- Kawabata M., Imamura T., Miyazono K. (1998). Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* **9(1)**, 49-61.
- Kawaguchi J., Kii I., Sugiyama Y., Takeshita S., Kudo A. (2001). The transition of cadherin expression in osteoblast differentiation from mesenchymal cells: consistent expression of cadherin-11 in osteoblast lineage. *J Bone Miner Res.* **16(2)**, 260-269.
- Kawasaki K., Aihara M., Honmo J., Sakurai S., Fujimaki Y., Sakamoto E., Fijimaki E., Wozney J.M., Yamaguchi A. (1998). Effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on differentiation of cells isolated from human bone, muscle, and skin. *Bone.* **23(3)**, 223-231.
- Kaysinger K.K., Ramp W.K., Lang G.L., Gruber H.E. (1997). Comparison of human osteoblasts and osteogenic cells from heterotopic bone. *Clin Orthop Relat Res.* **342**, 181-191.
- Kirker-Head C.A. (2000). Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins. *Adv Drug Deliv Rev.* **43(1)**, 65-92.
- Klein-Hitpaß L., Mörry T. (2001). DNA-Microarrays: eine neue Technologie zur Erstellung von RNA-Expressionsprofilen auf Genomebene. *Biospektrum.* **2**, 150-156.
- Kofron M.D., Li X., Laurencin C.T. (2004). Protein- and gene-based tissue engineering in bone repair. *Current Opinion in Biotechnology.* **15**, 1-7.
- Koller M.R., Maher R.J., Manchel I., Oxender M., Smith A.K. (1998). Alternatives to animal sera for human bone marrow cell expansion: human serum and serum-free media. *J Hematother.* **7(5)**, 413-423.
- Komarova S.V., Ataulakhanov F.I., Globus R.K. (2000). Bioenergetics and mitochondriell transmembrane potential during differentiation of cultured osteoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol.* **279**, C1220-C1229.
- Komori T., Yagi H., Nomura S., Yamaguchi A., Sasaki K., Deguchi K., Shimizu Y., Bronson R.T., Gao Y.-H., Inada M., Sato M., Okamoto R., Kitamura Y., Yoshiki S., Kishimoto T. (1997). Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturation arrest of osteoblasts. *Cell.* **89**, 755-764.
- Kon E., Muraglia A., Corsi A., Bianco P., Marcacci M., Martin I., Boyde A., Ruspanini I., Chistolini P., Rocca M., Giardino R., Cancedda R., Quarto R. (2000). Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mat Res.* **49(3)**, 328-337.
- Kose K.N., Xie J.F., Carnes D.L., Graves D. (1996). Pro-inflammatory cytokines downregulate platelet-derived growth factor  $\alpha$ -receptor gene expression in human osteoblastic cells. *J Cell Physiol.* **166**, 188-197.
- Kumar S., Votta B.J., Rieman D.J., Badger A.M., Gowen M., Lee J.C. (2001). IL-1- and TNF-induced bone resorption is mediated by p38 mitogen activated protein kinase. *J Cell Physiol.* **187(3)**, 294-303.
- Kuznetsov S., Mankani M.H., Robey P.G. (2000). Effect of serum on human bone marrow stromal cells: ex vivo expansion and in vivo bone formation. *Transplantation.* **70(12)**, 1780-1787.
- Kuznetsov S.A., Friedenstein A.J., Robey P.G. (1997). Factors required for bone marrow stromal fibroblasts colony formation in vitro. *Br J Haematol.* **97**, 561-570.
- Langer R., Vacanti J.P. (1993). Tissue Engineering. *Science.* **230**, 920-926.
- Lecanda F., Avioli L.V., Cheng S.L. (1997). Regulation of bone matrix protein expression and induction of differentiation of human osteoblasts and human bone marrow stromal cells by bone morphogenetic protein-2. *J Cell Biochem.* **67(3)**, 386-396.
- Lecanda F., Towler D.A., Ziambaras K., Cheng S.L., Koval M., Steinberg T.H., Civitelli R. (1998). Gap junctional communication modulates gene expression in osteoblastic cells. *Mol Biol Cell.* **9**, 2249-2258.
- Lecanda F., Warlow P.M., Sheikh S., Furlan F., Steinberg T.H., Civitelli R. (2000). Connexin-43 deficiency causes delayed ossification, craniofacial abnormalities, and osteoblast dysfunction. *J Cell Biol.* **151(4)**, 931-943.
- Lee J.Y., Peng H., Usas A., Musgrave D., Cummins J., Pelinkovic D., Jankowski R., Ziran B., Robbins P., Huard J. (2002). Enhancement of bone healing based on ex vivo gene therapy using human muscle-derived cells expressing bone morphogenetic protein 2. *Hum Gene Ther.* **13(10)**, 1201-1211.

- Levy M.M., Joyner C.J., Virdi A.S., Reed A., Triffitt J.T., Simpson A.H.R.W., Kenwright J., Stein H., Francis M.J.O. (2001). Osteoprogenitor cells of mature human skeletal muscle tissue: an in vitro study. *Bone*. **29(4)**, 317-322.
- Lieberman J.R., Le L.Q., Wu L., Finerman G.A., Berk A., Witte O.N., Stevenson S. (1998). Regional gene therapy with a BMP-2-producing murine stromal cell line induces heterotopic and orthotopic bone formation in rodents. *J Orthop Res*. **16(3)**, 330-339.
- Lin S.Ch., Yamate T., Taguchi Y., Borba V.Z.C., Girasole G., O'Brien Ch.A., Bellido T., Abe E., Manolagas S.C. (1997). Regulation of the gp90 and gp130 subunits of the IL-6 receptor by sex steroids in the murine bone marrow. *J Clin Invest*. **100(8)**, 1980-1990.
- Liu F., Malaval L., Aubin J.E. (1997). The mature osteoblast phenotype is characterized by extensive plasticity. *Exp Cell Res*. **232**, 97-105.
- Liu P., Oyajobi B.O., Russel R.G.G., Scutt A. (1999). Regulation of osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells: interaction between transforming growth factor-  $\beta$  and 1,25(OH) $_2$  vitamin D $_3$  in vitro. *Calcif Tissue Int*. **65**, 173-180.
- Locklin R.M., Riggs B.L., Hicok K.C., Horton H.F., Byrne M.C., Hhosla S. (2001). Assessment of gene regulation by bone morphogenetic protein 2 in human marrow stromal cells. *J Bone Miner Res*. **16(12)**, 2192-2204.
- Lynch M.P., Capparelli C, Stein J.L., Stein G.S., Lian J.B. (1998). Apoptosis during bone-like tissue development in vitro. *J Cell Biochem*. **68**, 31-49.
- Mackie E.J. (2003). Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol*. **35**, 1301-1305.
- Malaval L., Liu F., Roche P., Aubin J.E. (1999). Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro. *J Cell Biochem*. **74**, 616-627.
- Manolagas S.C. (1998). The role of IL-6 type cytokines and their receptors in bone. *Ann N Y Acad Sci*. **840**, 194-204.
- Manolagas S.C. (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*. **21(2)**, 115-137.
- Manolagas S.C., Jilka R.L., Bellido T., O'Brien Ch. A., Parfitt A.M. (1996). Interleukin-6-type cytokines and their receptors. In: Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G. A. (eds.) 'Principles of Bone Biology', Acad. Press, New York, 701-713.
- Mansukhani A., Bellosta P., Sahni M., Basilica C. (2000). Signaling by fibroblast growth factors (FGF) and fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-activating mutations block mineralization and induces apoptosis in osteoblasts. *J Cell Biol*. **149(6)**, 1297-1308.
- Marie P. J. (2002). Role of N-cadherin in bone formation. *J Cell Physiol*. **190**, 297-305.
- Marie P.J. (2003). Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. *Gene*. **316**, 23-32.
- Marie P.J., Hott M., Perheentupa J. (1989). Effects of epidermal growth factor on bone formation and resorption. *Am J Physiol*. **258**, E275-E281.
- Marks S.C., Hermey D.C. (1996). The structure and development of bone. In: Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G. A. (eds.) 'Principles of Bone Biology', Acad. Press, New York, 3-14.
- Martin I., Murgalia A., Campanile G., Cancedda R., Quarto R. (1997). Fibroblast growth factor-2 supports ex vivo expansion and maintenance of osteogenic precursors from human bone marrow. *Endocrinology*. **138(10)**, 4456-4462.
- McAlinden M.G., Wilson D.J. (2000). Comparison of cancellous bone-derived cell proliferation in autologous human and fetal bovine serum. *Cell Transplant*. **9**, 445-451.
- McCabe L.R., Kockx M., Lian J., Stein J., Stein G. (1995). Selective expression of fos- and jun-related genes during osteoblast proliferation and differentiation. *Exp Cell Res*. **218(1)**, 255-262.
- McCarthy T.L., Ji C., Casinghino S., Centrella M. (1998). Alternate signaling pathways selectively regulate binding of insulin-like growth factor I and II on fetal rat bone cells. *J Cell Biochem*. **68**, 446-456.
- McDonald F. (2004). Ion channels in osteoblasts: A story of two intracellular organelles. *Surgeon*. **2(2)**, 63-69.

- Meleti Z., Shapiro I.M., Adams C.S. (2000). Inorganic phosphate induces apoptosis of osteoblastic-like cells in culture. *Bone*. **27(3)**, 359-366.
- Middleton J., Arnott N., Walsh S., Beresford J. (1995). Osteoblasts and osteoclasts in adult human osteophyte tissue express the mRNAs for insulin-like growth factors I and II and the type I IGF-Receptor. *Bone*. **16**, 287-293.
- Minguell J.J., Erices A., Conget P. (2001). Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* (Maywood). **226(6)**, 507-520.
- Minuth W.W., Strehl R., Schumacher K. *Zukunftstechnologie Tissue Engineering*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2003.
- Miyazono K. (2000a). Positive and negative regulation of TGF- $\beta$  signaling. *J Cell Science*. **113**, 1101-1109.
- Miyazono K. (2000b). TGF- $\beta$  signaling by Smad proteins. *Cytokine Growth Factor Rev*. **11**, 5-22.
- Moghal N., Sternberg P.W. (1999). Multiple positive and negative regulators of signaling by the EGF-receptor. *Curr Opin Cell Biol*. **11**, 190-196.
- Morizono K., De Ugarte D.A., Zhu M., Zuk P., Elbarbary A., Ashjian P., Benhaim P., Chen I.S., Hedrick M.H. (2003). Multilineage cells from adipose tissue as gene delivery vehicles. *Hum Gene Ther*. **14(1)**, 59-66.
- Mueller S.M., Glowacki J. (2000). Construction and regulation of 3-dimensional bone tissue in vitro. In: Davies J.E. (eds.) 'Bone engineering', em<sup>2</sup> Inc., Toronto, 473-487.
- Mühlhardt C. (2000). *Der Experimentator: Molekularbiologie*. 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Mundy G.R., Chen D., Zhao M., Dallas S., Xu C., Harris S. (2001). Growth regulatory factors and bone. *Rev Endocr Metab Disord*. **2**, 105-115.
- Muschler G.F., Nitto H., Boehm C., Easley K.A. (2001). Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J Orthop Res*. **19**, 117-125.
- Nijweide P.J., Burger E.H., Klein N.J., Van der Plas A. (1996). The Osteocyte. In: Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G. A. (eds.) 'Principles of Bone Biology', Acad. Press, New York, 115-126.
- Nohe A., Hassel S., Ehrlich M., Neubauer F., Sebald W., Henis Y.I., Knaus P. (2002). The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem*. **277(7)**, 5330-5338.
- Nuttall M.E., Patton A.J., Olivera D.L., Nadeau D.P., Gowen M. (1998). Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders. *J Bone Miner Res*. **13(3)**, 371-381.
- Okumura M., Ohgushi H., Dohi Y., Katuda T., Tamai S., Koerten H.K., Tabata S. (1997). Osteoblastic phenotype expression on the surface of hydroxyapatite ceramics. *J Biomed Mat Res*. **37(1)**, 122-9.
- Oreffo R.O.C., Virdi A.S., Triffitt J T. (1997). Modulation of osteogenesis and adipogenesis by human serum in human bone marrow cultures. *Eur J Cell Biol*. **74**, 251-261.
- Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson S.M., Li B.S., Pickel J., McKay R., Krause D.S. (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. **410**, 701-705.
- Oswald J., Boxberger S., Jorgensen B., Feldmann S., Ehnunger G., Bornhauser W., Werner C. (2004). Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*. **22(3)**, 377-384.
- Otto F., Thornell A.P., Crompton T., Denzel A., Gilmour K.C., Rosewell I.R., Stamp G.W.H., Beddington R. S.P., Mundlos S., Olsen B.R., Selby P.B., Owen M. (1997). *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*. **89**, 768-771.
- Owen M. (1988) Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl*. **10**, 63-76.
- Owen T.A., Aronow M., Shalhoub V., Barone L.M., Wilming L., Tassinari M.S., Kennedy M.B., Pockwinse S., Lian J.B., Stein G.S. (1990). Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol*. **143**, 420-430.
- Park S.R., Oreffo R.O.C., Triffitt J.T. (1999). Interconversion potential of cloned human marrow adipocytes in vitro. *Bone*. **24 (6)** 549-554.
- Peck W.A., Birge S.J., Fedak S.A. (1964). Bone cells: biochemical and biological studies after enzymatic isolation. *Science*. **146**, 1476.

- Peng Y., Kang Q., Cheng H., Li X., Sun M.H., Jiang W., Luu H.H., Park J., Haydon R.C., He T.C. (2003). Transcriptional characterization of bone morphogenetic proteins (BMPs)-mediated osteogenic signaling. *J Cell Biochem.* **90**(6), 1149-1165.
- Pereira R. C., Rydziel S., Canalis E. (2000). Bone morphogenetic protein-4 regulates its own expression in cultured osteoblasts. *J Cell Physiol.* **182**, 239-246.
- Perry C.R. (1999). Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes. *Clin Orthop Relat Res.* **360**, 71-86.
- Peter S.J., Liang K.R., Kim D.J., Widmer M.S., Mikos A.G. (1998). Osteoblastic phenotype of rat marrow stromal cells cultured in the presence of dexamethasone,  $\beta$ -glycerolphosphate, and L-ascorbic acid. *J Cell Biochem.* **71**, 55-62.
- Pittenger M.F., Mackay, A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R.M., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* **284**, 143-147.
- Plattner H., Hentschel J. Zellbiologie. Thieme, Stuttgart, 2002.
- Plotkin L.I., Manolagas S.C., Bellido T. (2002). Transduction of cell survival signals by connexin-43. *J Biol Chem.* **277**(10), 8648-8657.
- Porter R.M., Huckle W.R., Goldstein A.S. (2003). Effect of dexamethasone withdrawal on osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem.* **90**, 13-22.
- Price P.A., Nguyen T.M.T., Williamson M.K. (2003). Biochemical characterization of the serum fetuin-mineral complex. *J Biol Chem.* **278**(24), 22153-22160.
- Prockop D.J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* **276**, 71-74.
- Punzel M., Ho A.D. (2002) Adulte Stammzellen - Bausteine für eine neue regenerative Medizin? *Speculum.* **2**, 14-17.
- Quarto R., Mastrogiacomo M., Cancedda R., Kutepov S.M., Mukhachev V., Lavroukov A., Kon E., Marcacci M. (2001). Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med.* **344**(5), 385-6.
- Reddi A.H. (1992). Regulation of cartilage and bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *Curr Opin Cell Biol.* **4**(5), 850-855.
- Reddi A.H. (2001). Interplay between bone morphogenetic proteins and cognate binding proteins in bone and cartilage development: noggin, chordin and DAN. *Arthritis Res.* **3**, 1-5.
- Reyes M., Lund T., Lenvik T., Aguiar D., Koodie L., Verfaillie C.M. (2001). Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood.* **98**(8), 2615-2625.
- Riedel G.E., Valentin-Opran A. (1999). Clinical evaluation of rhBMP-2/ACS in orthopedic trauma: a progress report. *Orthopedics.* **22**(7), 663-665.
- Ripamonti U., Tasker J.R. (2000). Advances in biotechnology for tissue engineering of bone. *Curr Pharm Biotechnol.* **1**(1), 47-55.
- Robey G.P., Termine J.D. (1985). Human bone cells in vitro. *Calcif Tissue Int.* **37**, 453-460.
- Robey P.G. (1996). Bone matrix proteoglycans and glycoproteins. In: Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G. A. (eds.) 'Principles of Bone Biology', Acad. Press, New York, 155-165.
- Rose F., Oreffo R. (2002). Bone tissue engineering: hope vs hype. *Biochem Biophys Res Commun.* **292**, 1-7.
- Rosen W., Cox K., Hattersley G. (1996). Bone morphogenetic proteins. In: Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G. A. (eds.) 'Principles of Bone Biology', Acad. Press, New York, 661-671.
- Rosert J., Crombrughe B. (1996). Type I Collagen : structure, synthesis, and regulation. In: Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G. A. (eds.) 'Principles of Bone Biology', Acad. Press, New York, 127-140.
- Roufosse C.A., Direkze N.C., Otto W.R., Wright N.A. (2004). Circulating mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol.* **36**, 585-597.

- Rundus V.R., Marshall G.B., Parker S.B., Bales E.S., Hertzberg E.L., Minkoff R. (1998). Association of cell and substrate adhesion molecules with connexin-43 during intramembranous bone formation. *Histochem J.* **30**(12), 879-896.
- Sacht G. (1998). Intrazelluläre Komponenten des IL-1-Rezeptorkomplexes. Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften vorgelegt an der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- Saadeh P.B., Mehrara B.J., Steinbrech D.S., Dudziak M.E., Greenwald J.A., Luchs J.S., Spector J.A., Ueno H., Gittes G.K., Longaker M.T. (1999). Transforming growth factor-beta 1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor by osteoblasts. *Am J Physiol.* **277**(4 Pt 1), C628-637.
- Sakou T. (1998). Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone.* **22**(6), 591-603.
- Sampath T.K., Reddi A.H. (1981). Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* **78**, 7599-7603.
- Sarugaser R., Lickorish D., Baksh D., Hosseini M.M., Davies J.E. (2005). Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells.* **23**(2), 220-229.
- Schauenstein K., Dohr G., Preisegger K.-H. (2003). Stammzellen aus dem Nabelschnurblut. *Journal für Fertilität und Reproduktion.* **4**, 9-13.
- Schecroun N., Delloye Ch. (2003). Bone-like nodules formed by human bone marrow stromal cells: comparative study and characterization. *Bone.* **32**, 252-260.
- Schecroun N., Delloye Ch. (2004). In vitro growth and osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells supported by autologous plasma. *Bone.* **35**, 517-524.
- Schlosser I. (2003). Zielgene des Proto-Onkogens c-Myc: Von der genomweiten Analyse zur ribosomalen RNA-Prozessierung. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades an der Biologischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Schuchhardt J., Beule D., Malik A., Wolski E., Eickhoff H., Lehrach H., Herzel H. (2000). Normalization strategies for cDNA microarrays. *Nucleic Acids Res.* **28**(10), e47, 1-5.
- Sell S., Gaissmaier C., Fritz J., Herr G., Eisenwein S., Küsswetter W., Volkmann R., Wittkowski K.M., Rodemann H.P. (1998). Different behavior of human osteoblast-like cells from normal and heterotopic bone. *Calcif Tissue Int.* **62**, 51-59.
- Sen A., Lea-Currie Y.R., Sujkowska D., Franklin D.M., Wilkison W.O., Halvorsen Y.D., Gimble J.M. (2001). Adipogenic potential of human adipose derived stromal cells from multiple donors is heterogeneous. *J Cell Biochem.* **81**(2), 312-319.
- Shaulian E., Karin M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol.* **4**, E131-E136.
- Shin H., Jo S., Mikos A.G. (2003). Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials.* **24**, 4353-4364.
- Shroff B., Kashner J.E., Keyser J.D., Hebert C., Norris K. (1996). Epidermal growth factor and epidermal growth factor-receptor expression in the mouse dental follicle during tooth eruption. *Arch Oral Biol.* **41**(6), 613-617.
- Siggelkow H., Rebenstorff K., Kurre W., Niedhart C., Engel I., Schulz H., Atkinson M.J., Hüfner M. (1999). Development of the osteoblast phenotype in primary human osteoblasts in culture: comparison with rat calvarial cells in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem.* **75**, 22-35.
- Skillington J., Choy L., Derynck R. (2002). Bone morphogenetic protein and retinoic acid signaling cooperate to induce osteoblast differentiation of preadipocytes. *J Cell Biol.* **159**(1), 135-146.
- Sobue T., Zhang X., Florkiewicz R. Z., Hurley M. M. (2001). Interleukin-1 regulates FGF-2 mRNA and localization of FGF-2 protein in human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* **286**, 33-40.
- Sodek J., Cheifetz S. (2000). Molecular regulation of osteogenesis. In: Davies J.E. (eds.) 'Bone engineering', em<sup>2</sup> Inc., Toronto, 31-43.
- Sodek J., Zhang Q., Goldberg H.A., Domenicucci, Kasugai S., Wrana J.L., Shapiro H., Chen J. (2001). Non-collagenous bone proteins and their role in substrate-induced bioactivity. In: Davies J.E. (eds.) 'The bone-biomaterial interface', em<sup>2</sup> Inc., Toronto, 97-110.
- Sottile V., Halleux C., Bassilana F., Keller H., Seuwen K. (2002). Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. *Bone.* **30**(5), 699-704.

- Spector J.A., Mehrara B.J., Greenwald J.A., Saadeh P.B., Steinbrech D.S., Bouletreau P.J., Smith L.P., Longaker M.T. (2000). Osteoblast expression of vascular endothelial growth factor is modulated by the extracellular microenvironment. *Am J Physiol Cell Physiol.* **280**, 72-80.
- Stein G.S., Lian J.B., Stein J.L., van Wijen A.J., Frenkel B., Montecino M. (1996). Mechanisms regulating osteoblast proliferation and differentiation. In: Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G. A. (eds.) 'Principles of Bone Biology', Acad. Press, New York, 69-86.
- Steinberg T.H., Civitelli R., Geist S.T., Robertson A.J., Hick E., Veenstra R.D., Wang H.-Z., Warlow P.M., Westphale E.M., Laing J.G., Beyer E.C. (1994). Connexin 43 and connexin 45 form gap junctions with different molecular permeabilities in osteoblastic cells. *EMBO J.* **13**, 744-750.
- Steinbrech D.S., Mehrara B.J., Saadeh P.B., Greenwald J.A., Spector J.A., Gittes G.K., Longaker M.T. (2000). VEGF expression in an osteoblast-like cell line is regulated by hypoxia response mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol.* **278**, 853-860.
- Suda T., Udagawa N., Takahashi N. (1996). Cells of bone: osteoclast generation. In: Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G. A. (eds.) 'Principles of Bone Biology', Acad. Press, New York, 87-102.
- Super microarray substrates handbook. TeleChem International Inc., 1999.
- Sweatt A., Sane D.C., Hutson S.M., Wallin R. (2003). Matrix Gla protein (MGP) and bone morphogenetic protein-2 in aortic calcified lesions of aging rats. *J Thromb Haemost.* **1(1)**, 178-185.
- Szczesny G. (2002). Molecular aspects of bone healing and remodeling. *Pol J Pathol.* **53(3)**, 145-153.
- Tamura S., Kataoka H., Matsui Y., Chionoya Y., Ohno K., Michi K.-I., Takahachi K., Yamaguchi A. (2001). The effects of transplantation of osteoblastic cells with bone morphogenetic protein (BMP)/carrier complex on bone repair. *Bone.* **29(2)**, 169-175.
- Tatakis D.N. (1993). Interleukin-1 and bone Metabolism: a review. *J Periodontol.* **64(5)**, 416-431.
- Teschner M. (1999). Tissue Engineering von Knochengewebe. Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete. **137(6)**, 4-7.
- Triffitt J. T. (1996). The stem cell of the osteoblast. In: Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G. A. (eds.) 'Principles of Bone Biology', Acad. Press, New York, 39-50.
- Tumber A., Meikle M.C., Hill P.A. (2000). Autocrine signals promote osteoblast survival in culture. *J Endocrinol.* **167**, 383-390.
- Urist M.R. (1965). Bone formation by autoinduction. *Science.* **150(698)**, 893-899.
- Väänänen K. (1996). Osteoclast function: biology and mechanism. In: Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G. A. (eds.) 'Principles of Bone Biology', Acad. Press, New York, 103-113.
- Valentin-Opran A., Wozney J., Csimma C., Lilly L., Riedel G.E. (2002). Clinical evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clin Orthop Relat Res.* **395**, 110-120.
- Varghese S., Canalic E. (2003). Transcriptional regulation of collagenase-2 by interleukin-1 alpha in osteoblasts. *J Cell Biochem.* **90**, 1007-1014.
- Vaux D.L., Strasser A. (1996). The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**, 2239-2244.
- Viereck V., Siggelkow H., Tauber S., Raddatz D., Schutze N., Hüfner M. (2002). Differential regulation of Cbfa1/Runx2 and osteocalcin gene expression by vitamin-D3, dexamethasone, and local growth factors in primary human osteoblasts. *J Cell Biochem.* **86**, 348-356.
- Voegelé T.J., Voegelé-Kadletz M., Esposito V., Macfelda K., Oberndorfer U., Vecsei V., Schabus R. (2000). The effect of different isolation techniques on human osteoblast-like cell growth. *Anticancer Res.* **20**, 3575-3582.
- Wagner E.F. (2002). Functions of AP-1 (Fos/Jun) in bone development. *Ann Rheum Dis.* **61(Suppl. II)**, ii40-ii42.
- Wagner E.F., Karsenty G. (2001). Genetic control of skeletal development. *Curr Opin Genet Dev.* **11**, 527-532.
- Wagner S. (2001). Microarrays – auf die Qualität des Trägers kommt es an. *Laborpraxis*, 10, 22-24.

- Wajih N., Borass T., Xue W., Hutson S.M., Wallin R. (2004). Processing and transport of matrix  $\gamma$ -carboxyglutamic acid protein and bone morphogenetic protein-2 in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* **279**(41), 43052-43060.
- Wang E.A., Israel D.I., Kella S., Luxenberg D.P. (1993). Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells. *Growth Factors.* **9**(1), 57-71.
- Wexler S.A., Donaldson C., Denning-Kendall P., Rice C., Bradley B., Ho J.M. (2003). Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal stem cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol.* **121**(2), 368-374.
- Wilgenbus K.K., Lichter P. (1999). DNA chip technology ante portas. *J Mol Med.* **77**, 761-768.
- Wilke A., Traub F., Knieapfel H., Griss P. (2001). Cell differentiation under influence of rh-BMP-2. *Biochem Biophys Res Commun.* **284**, 1093-1097.
- Wolf P. (2001). erbB-Rezeptoren und ihre Liganden im Kaninchen und ihre Expression während der Periimplantationsphase. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades der Medizin vorgelegt an der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Wozney J. (2002). Overview of Bone Morphogenetic Proteins. *Spine.* **27**(16S), S2-S8.
- Wozney J., Rosen W. (1998). Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop Relat Res.* **346**, 26-37.
- Wozney J.M., Rosen V., Celeste A.J., Mitscock L.M., Whitters M.J., Kriz R.W., Hewick R.M., Wang E.A. (1988). Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science.* **242**, 1528-1534.
- Wright S. (2000). Commentary: The bone-graft market in Europe. In: Davies J.E. (eds.) 'Bone engineering', em<sup>2</sup> Inc., Toronto, 473-487.
- Xiao G., Wang D., Benson M.D., Karsenty G., Franceschi R.T. (1998). Role of the  $\alpha$ 2-integrin in osteoblast-specific gene expression and activation of the *Osf2* transcriptional factor. *J Biol Chem.* **273**(49), 32988-32994.
- Xynos I.D., Edgar A.J., Buttery L.D.K., Hench L. L. Polak J.M. (2000). Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA Expression and protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* **276**, 461-465.
- Yamaguchi A., Komori T., Suda T. (2000). Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and *Cbfa1*. *Endocr Rev.* **21**(4), 393-411.
- Yamamoto N., Isobe M., Negishi A., Yoshimasu H., Shimokawa H., Ohya K., Amagasa T., Kasugai S. (2003). Effects of autologous serum on osteoblastic differentiation in human bone marrow cells. *J Med Dent Sci.* **50**(1), 63-69.
- Yang D., Chen J., Jing Z., Jin D. (2000). Platelet-derived growth factor (PDGF)-AA: a self-imposed cytokine in the proliferation of human fetal osteoblasts. *Cytokine.* **12**(8), 1271-1274.
- Yellowley C.E., Li Z., Zhou Z., Jacobs C.R., Donahue H.J. (2000). Functional gap junctions between osteocytic and osteoblastic cells. *J Bone Miner Res.* **15**, 209-217.
- Yoneda T. (1996). Local regulators of bone: epidermal growth factor-transforming growth factor- $\alpha$ . In: Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G. A. (eds.) 'Principles of Bone Biology', Acad. Press, New York, 729-738.
- Yoshikawa T., Ohgushi H., Ichijima K., Takakura Y. (2004). Bone regeneration of cultured human bone. *Tissue Eng.* **10**(5-6), 688-698.
- Yoshikawa T., Ohgushi H., Tamai S. (1996). Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite. *J Biomed Mat Res.* **32**(3), 481-492.
- Yu K., Xu J., Liu Z., Sosic D., Shao J., Olson E.N., Towler D.A., Ornitz D.M. (2003). Conditional inactivation of FGF receptor 2 reveals an essential role for FGF signaling in the regulation of osteoblast function and bone growth. *Development.* **130**, 3063-3074.
- Zhang L., Leeman E., Carnes D.C., Graves D.T. (1991). Human osteoblasts synthesize and respond to platelet-derived growth factor. *Am J Physiol.* **361**(2 Pt1), 348-354.
- Zhang M., Xuan S., Bouxsein M.L., von Stechow D., Akeno N., Faugere M.C., Malluche H., Zhao G., Rosen C.J., Efstratiadis A., Clemens T.L. (2002). Osteoblast-specific knockout of the insulin-like growth factor (IGF) receptor gene reveals an essential role of IGF signaling in bone matrix mineralization. *J Biol Chem.* **277**(46), 44005-44012.



- Zhao G.Q. Zhou X., Eberspaecher H., Solursh M., de Crombrughe B. (1993). Cartilage homeoprotein 1, a homeoprotein selectively expressed in chondrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. **90**, 8633-8637.
- Zimmermann C.M., Padgett R.W. (2000). Transforming growth factor  $\beta$  signaling mediators and modulators. *Gene*. **249**, 17-30.
- Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. **7(2)**, 211-228.